



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

## MÁSTER EN PRODUCCIÓN ANIMAL

### **Conceptos Básicos para el Diseño de un Estabulario Universitario**

Tesis de Máster  
Valencia, Septiembre 2012  
**David García Cerdá**

**Director interno:**  
Enrique Blas Ferrer  
**Director externo:**  
José Miguel Lloris Carsí

## ÍNDICE:

---

### **1. INTRODUCCIÓN:**

#### **1.1. Objetivos del proyecto**

#### **1.2. Introducción histórica a la experimentación animal**

#### **1.3. Definiciones**

- Animal de laboratorio
- Experimentación animal
- Estabulario

#### **1.4. Percepción social de un centro de investigación animal**

### **2. MARCO LEGAL:**

#### **2.1. Normativa de la Unión Europea**

#### **2.2. Normativa de España**

#### **2.3. Normativa de la Comunidad Valenciana**

### **3. FISIOLÓGÍA Y MANTENIMIENTO DE LAS ESPECIES DE EXPERIMENTACIÓN:**

#### **3.1. Listado de animales de experimentación susceptibles de ser alojados en el estabulario**

#### **3.2. Fichas Técnicas**

### **4. DISEÑO DE LAS INSTALACIONES:**

#### **4.1. Definición de las distintas áreas**

- 4.1.1. Áreas de animales
- 4.1.2. Áreas de servicios
- 4.1.3. Áreas de intercomunicación

#### **4.2. Diseño del edificio**

- 4.2.1. Plano
- 4.2.2. Dimensiones
- 4.2.3. Capacidad máxima de animales en los alojamientos
- 4.2.4. Distribución de las instalaciones
- 4.2.5. Tránsito dentro del centro
- 4.2.6. Particularidades del sistema de ventilación
- 4.2.7. Conceptos básicos para los materiales de construcción

4.2.8. Equipamiento básico

## **5. MEDIDAS DE CONTROL MICROBIOLÓGICO:**

### **5.1. Sistemas de barrera**

- 5.1.1. Filtración mecánica del aire
- 5.1.2. Sistema de presiones diferenciales
- 5.1.3. Filtración y tratamiento del agua
- 5.1.4. Plaguicidas e insecticidas
- 5.1.5. Autoclaves y equipos de esterilización
- 5.1.6. Recogida de desechos
- 5.1.7. Prácticas a llevar a cabo por el personal
- 5.1.8. Control de visitas a las instalaciones

### **5.2. Medidas de control sanitario en los animales**

## **6. ALIMENTACIÓN DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN:**

### **6.1. Tipos de dietas**

### **6.2. Regímenes alimenticios**

### **6.3. Conservación y control de calidad de las dietas**

- 6.3.1. Almacenamiento de las dietas
- 6.3.2. Contaminantes abióticos, bióticos, y método de esterilización

## **7. BIENESTAR ANIMAL:**

### **7.1. Indicadores de enfermedad, dolor o sufrimiento**

### **7.2. Medidas correctoras**

### **7.3. Enriquecimiento ambiental**

- 7.3.1. Medidas de enriquecimiento ambiental para cada especie

## **8. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES:**

### **8.1. Administración de sustancias y vías**

### **8.2. Toma de muestras**

- 8.2.1. Sangre
- 8.2.2. Heces y orina
- 8.2.3. Otros fluidos corporales
- 8.2.4. Biopsia

### **8.3. Procedimientos quirúrgicos básicos en la rata**

- 8.3.1. Laparotomía

8.3.2. Acceso a grandes vasos: cateterización de la vena yugular

8.3.3. Castración: ovariectomía y orquiectomía

8.3.4. Cesárea

#### **8.4. Anestesia y analgesia**

8.4.1. Manejo del animal

8.4.2. El ayuno

8.4.3. Protocolos anestésicos

#### **8.5. Eutanasia**

8.5.1. Criterios para una muerte humanitaria

8.5.2. Métodos de eutanasia

a) Físicos

b) Farmacológicos

### **9. BIBLIOGRAFÍA:**

**9.1. Legislación**

**9.2. Publicaciones**

**9.3. Páginas web (fecha de consulta)**

---

## **1. INTRODUCCIÓN:**

### **1.1. Objetivos del proyecto**

Este proyecto pretende abarcar las principales cuestiones a tener en cuenta a la hora de diseñar y organizar un estabulario, es decir, unas instalaciones donde poder criar y mantener animales de experimentación y donde poder trabajar con ellos, teniendo siempre en mente que se cumplan los máximos estándares de bienestar animal y bioseguridad.

También se pretende definir las distintas actividades que podría acoger un centro de esas características cuando está asociado a una Universidad como es en este caso. La Universidad, como concepto global, tiene la obligación de dar un servicio a la sociedad en la formación de personas cualificadas en las disciplinas que imparte, que a su vez sean el motor de un beneficio social y de una transferencia de conocimientos y descubrimientos que impacten positivamente en su entorno.

La intención de una Universidad al contruir un centro de investigación con animales no debe ser otra que poner al servicio de los profesores, de los alumnos y de la sociedad en general, un instrumento de desarrollo tecnológico que incida positivamente en las actividades propias de la misma, docencia e investigación.

### **1.2. Introducción histórica a la experimentación animal**

Los inicios de la experimentación se basan en las prácticas místico-religiosas de los chamanes que se dieron en el período Preclásico. De estos ritos se conservan grabados y pinturas que muestran como abrían en canal los animales cazados y extraían conclusiones de la disposición de las vísceras. En esta época destaca como hito la aparición del Código de Hammurabi (año 1.700 a.C.) que a parte de recoger prácticas religiosas, es el primer documento escrito donde se describen diversas enfermedades de animales así como su tratamiento con drogas o ungüentos.

A continuación, se hicieron grandes avances durante el período Clásico. La civilización griega, origen de la cultura occidental, se ha distinguido por su actitud racional ante la interpretación del Cosmos. A ella pertenece el primer investigador biológico del que se tiene constancia, **Acmaeon de Crotona**, quien demostró la función del nervio óptico al seccionarlo y con ello producir la ceguera de un animal (año 450 a.C.). Poco después, **Aristóteles** (384-322 a.C.), que era hijo de un médico, afirmó en uno de sus tratados que en muchos de los aspectos biológicos no había diferencias entre humanos, perros y caballos. Más tarde, **Mitriades VI** rey del Ponto, apodado "El Grande", por miedo a ser envenenado ordenó a su médico efectuar ensayos con animales a los que daba a probar distintos venenos y sus antídotos, iniciando así la toxicología experimental. El Imperio Romano aportó a **Galeno** (130-210 d.C.), a quien se debe una sustancial mejora en las técnicas de disección, ya que

practicó en un gran número de especies animales.

Posteriormente, durante la Edad Media, no solo se produjo un parón, sino incluso un retroceso en los conocimientos que habían sido ya establecidos. Lo único destacable de esta época fue el denominado Código de Breslau, perteneciente a la Escuela Salernitana de Medicina y que influyó bastante en Europa. En él se describen métodos quirúrgicos llevados a cabo en el cerdo, por ser "el animal más parecido al hombre".

Durante el Renacimiento se comenzó a desarrollar la técnica de la autopsia, es decir, la realización de estudios anatómicos con cadáveres. Esto hizo que se avanzara mucho en el conocimiento del cuerpo humano, y se investigaran las funciones de los distintos órganos y sistemas lo que condujo de nuevo a la investigación con animales. En Inglaterra, **Francis Bacon** (1561-1626) defiende la experimentación animal afirmando que es recomendable para el avance de la ciencia "en vista del gran uso que se hace de sus observaciones", como aparece en *Proficiency and Advancement of Learning Divine and Humane*, publicado en 1605.

Otro hecho importante fue el descubrimiento por parte de **William Harvey** de la función del corazón como bomba de la sangre. Explicó la circulación sanguínea, como la sangre llega al corazón por la vena cava y es expedida por la aorta, diseccionando serpientes en su *Exercitatio Anatomica de Motu Cordis et Sanguis in Animalibus*. Fue en esta época cuando la publicación de resultados originales empezó a considerarse como algo meritorio para los investigadores.

En la Ilustración comenzó la discusión entre quienes tienen en cuenta el sufrimiento animal (antiviviseccionistas) y los que creen que es prioritaria la necesidad de los estudios. En un ambiente de descubrimientos, entrecruzamientos de observaciones, hipótesis, discusiones y grandes adelantos fue **Luigi Galvani** (1737-1798) físico y médico, quien habiendo decapitado y despellejado unas ranas, las dejó cerca de una máquina eléctrica y, por casualidad, observó que al tocar una de ellas con un objeto metálico se contrajo su musculatura. Galvani, interesado por la coincidencia, comenzó una serie de experiencias cuyos resultados recogió en su obra *De viribus electricitatis in motu musculari*, que recoge el fenómeno que más tarde se apodó como galvanismo. **Lazzaro Spallanzani** (1729-1799), quien dedicó parte de sus estudios al sistema gastroentérico, analizó el jugo gástrico de diversas especies de animales y el humano, llegando a la conclusión de que cada especie condiciona su composición a la necesaria para digerir los alimentos característicos de su dieta. Dichas experiencias se realizaron con ácidos, bases y trozos de estómagos en tubos de ensayo, por lo que se puede considerar a Spallanzani como el iniciador de las pruebas de laboratorio *in vitro*. Por otra parte, la fundación en 1790 de la Escuela de Veterinaria de Alfort, Francia, da origen a la implantación de verdaderas escuelas de investigación biológica en el país, que liderará los estudios fisiológicos durante lo que resta de siglo.

Durante los inicios del siglo XIX destaca el ruso **Ivan Pavlov** (1849-1936), comenzó a hacer experiencias que mezclaban fisiología y comportamiento animal. Realizó las célebres pruebas de

salivación en perros adiestrados para reconocer señales acústicas, estableciendo la teoría de los reflejos condicionados. Por otra parte, fueron notables sus aportaciones sobre el sistema digestivo, la función hepática, del páncreas y del aparato cardiovascular. En el siglo XIX se desarrolla la bacteriología y la inmunología, destacando, entre muchos autores, **Louis Pasteur** (1822-1895), que experimentó con la vacuna del antrax en ovejas, del cólera en gallinas y de la rabia en perros; **Robert Koch** (1842-1919), que logró aislar el bacilo de la tuberculosis, **Paul Erlich** (1854-1919), que hizo progresar la histología y impulsó la inmunología con su teoría de "la llave y la cerradura", y, por último, **Rudolph Magnus**, quien ideó el sistema para mantener vivo un órgano aislado en el denominado *baño de órganos*, todos ellos realizando experiencias con animales.

La mayor expansión de las ciencias biomédicas ha tenido lugar durante el siglo XX. Existe una infinidad de avances técnicos y de conocimiento que han tenido lugar en el pasado siglo, de forma que ahora se dispone de determinaciones y técnicas que no hace mucho tiempo eran impensables. Así, por ejemplo, fue el desarrollo de los anestésicos lo que facilitó las experiencias *in vivo* sin dolor. El perfeccionamiento de las técnicas permitió experimentos como el de **Alexis Carrel** (1873-1944), quien mantuvo el corazón de un pollo latiendo durante meses fuera de su cuerpo. Otros grandes hitos fueron los descubrimientos de **Santiago Ramón y Cajal** (1852-1934), que describió la estructura y función cerebro-espinal, y **Camillo Golgi** (1884-1923), quien desarrolló ampliamente las técnicas histológicas. También destaca **Willem Einthoven** (1860-1927), quien desarrolló el electrocardiograma gracias a sus trabajos con animales que padecían problemas cardíacos. Durante este siglo también se avanzó en la conciencia de que hay que utilizar el menor número posible de animales.

### 1.3. Definiciones

**-Animal de Laboratorio:** El concepto ha ido variando últimamente. A partir de los años 60 encajaba con el de reactivo biológico, es decir, animal utilizado en experiencias científicas, en función del tema de estudio, capaz de dar una respuesta fiable y reproducible. Su pureza debe ser vigilada, controlada y contrastada, lo mismo que cualquier otro reactivo químico o físico, sin olvidar su posible contaminación tanto biótica como abiótica, que puede distorsionar los resultados durante el proceso experimental. Por otra parte, para asegurar la repetibilidad de los experimentos se debe emplear animales homogéneos, así que asociado al concepto de reactivo biológico está el de homogeneidad del mismo, habiendo diversos tipos:

- Homogeneidad somática: igualdad de sexo, peso o edad. Fácil en roedores pero más complejo en animales grandes.
- Homogeneidad genética: obtenida por una tasa de consanguinidad elevada.

- Homogeneidad sanitaria: necesaria para evitar estados patológicos no deseados. Es este grado de homogeneidad el que determina las categorías de los animales y las instalaciones donde se deben producir y/o mantener.

El término de animal de laboratorio se refiere a animales biológicamente estandarizados, genéticamente uniformes, los cuales deben pasar controles genéticos, nutricionales, higiénicos y epidemiológicos de forma regular. También deben estandarizarse las variables ambientales de su espacio vital.

Durante los últimos años, el concepto de animal de laboratorio está experimentando cambios, ha pasado de ser solo un reactivo biológico a ser un paciente. Es decir, cada vez se están utilizando más modelos experimentales no basados en poblaciones sino en único animal. A esto hay que sumarle que cada vez se lleva mayor control sobre los aspectos relacionados con su bienestar, la aportación de enriquecimiento ambiental y pautas para desarrollar el comportamiento y todo tipo de técnicas para minimizar el estrés y el malestar. Todo esto ha dejado de ser meramente teórico para ser aplicado por la legislación y controlado por Comités Éticos de Experimentación Animal.

**-Experimentación Animal:** Se define como una actividad que tiene como objetivo aclarar fenómenos biológicos sobre especies animales determinadas. Aunque también es cualquier acto experimental o científico que entrañe un ataque al estado de bienestar del animal, susceptible de causarle dolor, sufrimiento, angustia o agravio. Este doble concepto, destacando el enfoque proteccionista, está incluido en la Directiva del Consejo 86/609CEE. La significación de la utilización de animales como reactivos biológicos, en el contexto de la investigación científica, vendría dada por los beneficios derivados de su uso y por la importancia cuantitativa (número de animales utilizados). Es destacable que la experimentación animal ha favorecido el avance en multitud de campos incluyendo la sanidad humana y animal, la agroalimentación, los desarrollos de procesos biotecnológicos o la investigación genómica, entre otros.

**-Estabulario:** Centro cuyos objetivos van desde la producción de reactivos biológicos de alta calidad, hasta el mantenimiento de especies o cepas no producidas en esas instalaciones. En ellos se debe evitar la intromisión de animales y personas incontroladas y llevar una permanente vigilancia de poblaciones, garantizando las líneas genéticas y el perfecto estado sanitario. Este tipo de centros sirven de suministrador a los investigadores y/o mantienen a los animales durante la fase experimental, asesorando a otros centros productores o a los usuarios, en las fases pre/ y post-experimental (elección de modelo, tamaño de muestra, consulta bibliográfica, bienestar y salud de la especie elegida...). En ellos se puede realizar la centralización de otros elementos relacionados con el animal (material y equipamiento) y el desarrollo de investigación relacionada con el animal de experimentación, además de la formación y especialización de profesionales del sector.



#### 1.4. Percepción social de un centro de investigación animal

En las últimas décadas se ha podido apreciar un mayor interés y valoración de la vida animal en los países más desarrollados. Cada vez son más comunes las organizaciones no gubernamentales que centran su actividad en defender el bienestar animal, y el movimiento proteccionista se contempla hoy bajo un prisma muy diferente a cuando surgió y se consideraba como un entretenimiento propio de personas bien situadas económica y socialmente. Ahora la sociedad ha progresado hacia un mayor estado de bienestar y el nivel de conocimientos también se ha elevado, lo que ha ayudado a crear un clima propicio para la creación de leyes que defiendan los derechos de los animales. A medida que avanza el conocimiento científico y tecnológico y que su acción interviene de forma más acusada en la vida cotidiana crece la concienciación de la necesidad de extender la reflexión social sobre los problemas éticos que presenta la experimentación animal. En paralelo, el movimiento proteccionista actúa con mucha fuerza influyendo en los Comités Éticos.

El hecho de que los aspectos éticos sean uno de los requerimientos legales para la experimentación animal confirma que la cuestión del uso de animales debe ser visto principalmente como un tema moral. Pero, ni leyes ni normativas alcanzan a ser cumplidas en su totalidad sin el complemento que supone la motivación y la responsabilidad de científicos y profesionales involucrados.

Dentro de la comunidad científica ha surgido una eficaz normativa para la adecuación de la experimentación animal a principios éticos, complementando la legislación vigente al respecto. Las actitudes básicas que deben regir el uso de animales, no únicamente por parte de los experimentadores sino también por el resto de la sociedad, son: respeto, afecto y gratitud. A este respecto, se han establecido y enumerado los "Principios Éticos en Investigación y Docencia con Modelos Animales":

1. Se debe evitar el uso de animales cuando exista un método alternativo que proporcione resultados satisfactorios.
2. El beneficio final del uso de animales de experimentación debe estar claramente definido en cada protocolo. La evaluación de la necesidad de su uso debe realizarse a través de un Comité Ético de Experimentación Animal.
3. Los ensayos que incluyan animales como modelo experimental deben realizarse en Establecimientos Usuarios registrados. Los animales deben proceder de Establecimientos de Cría registrados en aquellos casos que así lo establezca la legislación vigente.
4. Las personas que tomen parte en los experimentos (diseño, manipulaciones, cuidados) deben tener formación específica en las ciencias del animal de laboratorio. Los animales estarán siempre bajo control veterinario.
5. En cada ensayo hay que utilizar el mínimo número de animales posible que garantice resultados estadísticamente fiables.

6. Los animales tienen que ser estabulados en jaulas y recintos apropiados, en espacios con condiciones ambientales estandarizadas y controladas. Igualmente debe estar garantizada la posibilidad de que los animales desarrollen los comportamientos propios de su especie siempre que las necesidades experimentales lo permitan.
7. Los ensayos deben realizarse con un grado de refinamiento que evite el dolor, sufrimiento o angustia de los animales. Se deben establecer criterios de punto final y pautas de anestesia y analgesia en función de la severidad de cada procedimiento.
8. Para la eutanasia, cuando sea necesaria, se debe aplicar un método ético y científicamente aprobado que reduzca al máximo el dolor y el estrés en los animales.

## **2. MARCO LEGAL:**

La organización de este apartado va a ser de lo más general a lo más específico, es decir, se revisará primero la legislación vigente en Europa, después la de España y por último la de la Comunidad Valenciana. No se va a incluir cada uno de los artículos legales, únicamente se revisarán los puntos más interesantes a la hora de regular un estabulario. Además, muchos de los puntos que incluyen estas leyes, como las dimensiones de los alojamientos, ya van a aparecer en otro apartado de este proyecto debido a que todo el diseño debe ajustarse estrictamente a lo que dicta la legislación. Por ese motivo, y con ánimo de no ser repetitivo, esos puntos tampoco van a ser incluidos en este apartado.

Todos los documentos legales vigentes respecto al manejo y utilización de animales de experimentación hablan en algún momento del concepto de las tres R:

### **Reemplazar, Reducir y Refinar.**

Reemplazar: Utilización, en la medida de lo posible, de materiales no sensibles como bacterias, baño de órganos, cultivos celulares, modelos matemáticos, etc, en lugar de animales vivos.

Reducir: Utilizar el menor número de animales posible para obtener resultados en cada procedimiento. Esto se consigue mediante la mejora de los diseños y mediante la disminución de la variabilidad de los resultados, es decir, mejorando el control de los factores que pueden alterar los resultados, como por ejemplo: las variables ambientales del alojamiento, la calidad de la alimentación o la homogeneidad de los animales utilizados.

Refinar: disminuir la incidencia y severidad de los procedimientos en los animales, mejorando la analgesia, anestesia y eutanasia. Para llevar a cabo dichas mejoras es indispensable el reconocimiento de los signos de dolor, estrés o malestar, así como conocer el normal comportamiento de cada especie y cubrir las necesidades de espacio y enriquecimiento ambiental de los animales.

### **2.1. Normativa de la Unión Europea**

La norma que rige a todos los países de la Unión Europea es la **DIRECTIVA 2010/63/UE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO** del 22 de septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos. Esta directiva surgió como sustituta de la 86/209/UE porque la antigua mostraba demasiadas ambigüedades con respecto a criterios concretos y tampoco tenía en cuenta la necesidad de instaurar Comités de Ética o la utilización de animales modificados genéticamente, de formas fetales o de animales invertebrados. En esta nueva directiva se solventan algunos de esos problemas, no obstante, quizá sigue pecando de ambigüedad puesto que a lo largo

de sus 6 capítulos, 66 artículos y 8 anexos se siguen dejando muchos aspectos a la legislación propia de cada país. Esto tiene la ventaja de que los países que pretenden ser más proteccionistas con sus normas nacionales van a poder serlo pero, por contra, deja a libre elección los métodos de anestesia y eutanasia lo que puede dar lugar a aplicaciones más laxas de la legislación.

A este último efecto, el artículo 2 dicta que:

#### **Artículo 2: Medidas nacionales más estrictas**

1. Los Estados miembros podrán mantener aquellas disposiciones que, estando ya vigentes el 9 de noviembre de 2010, estén dirigidas a asegurar una protección más extensa a los animales incluidos en el ámbito de aplicación de la presente Directiva que las recogidas en ella. Antes del 1 de enero de 2013, los Estados miembros informarán a la Comisión de dichas disposiciones nacionales. La Comisión las pondrá en conocimiento de los demás Estados miembros.
2. Cuando actúen conforme a lo dispuesto en el apartado 1, los Estados miembros no prohibirán ni impedirán el suministro o el uso de animales criados o mantenidos en otro Estado miembro de conformidad con la presente Directiva, ni prohibirán ni impedirán la comercialización de productos elaborados con la utilización de dichos animales conforme a la presente Directiva.

Otro de los aspectos importantes es la prohibición de utilizar animales salvajes o vagabundos para la experimentación, como exponen los artículos 9 y 11, ya que los animales de experimentación deben ser criados con tal objetivo, como recoge el artículo 10:

#### **Artículo 9: Animales capturados en la naturaleza**

1. No se utilizarán en procedimientos animales capturados en la naturaleza.
2. Las autoridades competentes podrán conceder exenciones a lo dispuesto en el apartado 1 si está justificado científicamente que la finalidad del procedimiento no puede alcanzarse utilizando un animal criado para utilizarlo en procedimientos.
3. La captura de animales en la naturaleza únicamente se efectuará por personas competentes con métodos que no causen a los animales dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero que pueda evitarse.

Cualquier animal que se encuentre, durante o después de la captura, herido o enfermo será examinado por un veterinario u otra persona competente y se adoptarán medidas destinadas a minimizar el sufrimiento del animal. Las autoridades competentes podrán conceder exenciones al requisito de actuar para minimizar el sufrimiento del animal si hay una justificación científica.

## **Artículo 10: Animales criados para utilizarlos en procedimientos**

1. Los Estados miembros velarán por que los animales pertenecientes a las especies enumeradas en el anexo I solo puedan utilizarse en procedimientos si han sido criados para utilizarlos a tal fin.

No obstante, a partir de las fechas fijadas en el anexo II, los Estados miembros velarán por que los primates no humanos incluidos en ese anexo solo puedan utilizarse en procedimientos si son descendientes de primates no humanos criados en cautividad o si proceden de colonias autosostenibles.

A efectos del presente artículo, se entenderá por «colonia autosostenible» una colonia en la que solo se críen animales de la colonia u procedentes de otras colonias pero no animales capturados en la naturaleza; en estas colonias se mantendrá a los animales de manera que estén acostumbrados a los seres humanos.

La Comisión, en consulta con los Estados miembros y los interesados, realizará un estudio de viabilidad que incluirá una evaluación del bienestar y la salud animal en lo que se refiere al requisito contemplado en el párrafo segundo. El estudio se publicará a más tardar el 10 de noviembre de 2017 e irá acompañado, cuando proceda, de propuestas de modificación del anexo II.

2. La Comisión mantendrá bajo supervisión el uso de primates no humanos procedentes de colonias autosostenibles y, en consulta con los Estados miembros y los interesados, hará un estudio para analizar la viabilidad de obtener animales únicamente de colonias autosostenibles.

El estudio se publicará a más tardar el 10 de noviembre de 2022.

3. Las autoridades competentes podrán conceder exenciones a lo dispuesto en el apartado 1 si está justificado científicamente.

## **Artículo 11: Animales asilvestrados y vagabundos de especies domésticas**

1. No se utilizarán en procedimientos animales asilvestrados y vagabundos de especies domésticas.

2. Las autoridades competentes podrán conceder exenciones a lo dispuesto en el apartado 1, siempre que se cumplan las siguientes condiciones:

a) existe una necesidad esencial de estudios relativos a la salud y al bienestar de estos animales o se plantean amenazas graves para el medio ambiente o para la salud humana o animal, y

b) se ha justificado científicamente que la finalidad del procedimiento únicamente puede conseguirse utilizando un animal vagabundo o asilvestrado.

Esta Directiva demuestra una mayor concienciación por el dolor animal, a este respecto destacan los artículos 15 y 16 que suponen la clasificación de los procedimientos y las condiciones en las que un animal puede ser reutilizado durante un procedimiento.

## **Artículo 15: Clasificación de la severidad de los procedimientos**

1. Los Estados miembros velarán por que todos los procedimientos se clasifiquen como «sin recuperación», «leves», «moderados» o «severos», caso por caso, en función de los criterios de clasificación establecidos en el anexo VIII.

2. A reserva de la cláusula de salvaguardia enunciada en el artículo 55, apartado 3, los Estados miembros velarán por que no se realice un procedimiento si implica dolor severo, sufrimiento o angustia que pueda ser duradero y que no pueda experimentar una mejoría.

A continuación adjunto el anexo que detalla la descripción de las categorías de procedimientos.

## **ANEXO VIII: CLASIFICACIÓN DE LA SEVERIDAD DE LOS PROCEDIMIENTOS**

La severidad de un procedimiento irá determinada por el grado de dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero que se prevé que experimente un animal individual durante el procedimiento.

### **Sección I: Categorías de severidad**

#### No recuperación:

Los procedimientos que se realizan enteramente bajo anestesia general tras la cual el animal no recuperará la conciencia deben clasificarse como de no recuperación.

#### Leve:

Los procedimientos en animales a consecuencia de los cuales es probable que experimenten dolor, sufrimiento o angustia leves de corta duración, así como los procedimientos sin alteración significativa del bienestar o del estado general de los animales deben clasificarse como leves.

#### Moderado:

Los procedimientos en animales a consecuencia de los cuales es probable que experimenten dolor, sufrimiento o angustia moderados de corta duración, o leves pero duraderos, así como los procedimientos que pudieran causar una alteración moderada del bienestar o el estado general de los animales deben clasificarse como moderados.

#### Severo:

Los procedimientos en animales a consecuencia de los cuales es probable que experimenten dolor, sufrimiento o angustia intensos, o moderados pero duraderos, así como los procedimientos que pudieran causar una alteración grave del bienestar o del estado general de los animales deben clasificarse como severos.

### **Sección II: Criterios de atribución**

La atribución de la categoría de severidad tendrá en cuenta cualquier intervención o

manipulación de un animal en un procedimiento determinado. Se basará en los efectos más severos que pueda experimentar un animal después de aplicar todas las técnicas apropiadas de refinamiento.

Los factores relativos al procedimiento deben incluir:

- el tipo de manipulación, el tratamiento,
- la naturaleza del dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero causados por el procedimiento, su intensidad, duración y frecuencia y la multiplicidad de técnicas empleadas,
- el sufrimiento acumulativo en un procedimiento,
- la prevención de la expresión del comportamiento natural incluidas las restricciones en las normas de alojamiento, zootécnicas y de cuidado de los animales.

En la sección III se facilitan ejemplos de procedimientos atribuidos a cada categoría de severidad sobre la base de los factores relativos al tipo de procedimiento de que se trate. Facilitarán la primera indicación sobre la clasificación que sería la más adecuada para un determinado tipo de procedimiento.

Sin embargo, a efectos de la clasificación final de severidad del procedimiento, se tendrán en cuenta los siguientes factores adicionales, evaluados caso por caso:

- tipo de especie y genotipo,
- madurez, edad y sexo del animal,
- experiencia de formación del animal en el procedimiento,
- si se reutiliza el animal, la severidad real de los procedimientos anteriores,
- los métodos utilizados para reducir o suprimir el dolor, el sufrimiento y la angustia, incluidos refinamiento de condiciones de alojamiento, zootécnicas y de cuidado de los animales,
- uso de puntos finales incruentos.

### **Sección III:**

Ejemplos de diversos tipos de procedimiento atribuidos a cada categoría de severidad sobre la base de los factores relativos al tipo de procedimiento:

#### **1. Leve:**

- a) Administración de anestesia, salvo para el único propósito de sacrificar;
- b) Estudio farmacocinético donde se administra una única dosis y se recoge un número limitado de muestras de sangre (totalizando < 10 % del volumen circulante) y no se prevé que la sustancia cause ningún efecto nocivo perceptible;
- c) Técnicas no invasivas de diagnóstico por imagen en animales (por ejemplo resonancia magnética) con la sedación o la anestesia apropiadas;

- d) Procedimientos superficiales, por ejemplo biopsias de oreja y rabo, implantación subcutánea no quirúrgica de minibombas y transpondedores;
- e) Aplicación de dispositivos exteriores de telemetría que únicamente causan al animal un debilitamiento menor o una interferencia menor con la actividad y el comportamiento normales;
- f) Administración de sustancias por vía subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, por sonda gástrica e intravenosa a través de los vasos sanguíneos superficiales, donde la sustancia solo tiene un efecto leve en el animal, y los volúmenes se encuentran dentro de límites apropiados para el tamaño y la especie del animal;
- g) Inducción de tumores, o tumores espontáneos, que no causan ningún efecto nocivo clínico perceptible (por ejemplo, nódulos pequeños, subcutáneos, no invasivos);
- h) Cría de animales genéticamente modificados que se prevé que dé lugar a un fenotipo con efectos leves;
- i) Alimentación con dietas modificadas, que no cubren las necesidades nutricionales de todos los animales y se prevé que causen una anomalía clínica leve en el período de estudio;
- j) Confinamiento a corto plazo (< 24 h) en jaulas metabólicas;
- k) Estudios que implican la privación a corto plazo de interlocutores sociales, enjaulado solitario a corto plazo de ratas o ratones adultos de cepas gregarias;
- l) Modelos que exponen al animal a estímulos nocivos que se asocian brevemente con dolor, sufrimiento o angustia leve, y que el animal puede evitar;
- m) Una combinación o una acumulación de los siguientes ejemplos puede dar lugar a una clasificación leve:
  - i. Evaluación de la composición corporal a través de mediciones no invasivas y restricción mínima,
  - ii. Supervisión ECG con técnicas no invasivas con una restricción mínima o nula de animales habituados,
  - iii. Aplicación de dispositivos exteriores de telemetría que no se prevé que causen ningún impedimento a animales socialmente adaptados y que no interfieren con la actividad y el comportamiento normales,
  - iv. Cría de animales genéticamente modificados que no se espera que tengan ningún fenotipo adverso clínicamente perceptible,
  - v. Adición a la dieta de marcadores inertes para seguir el paso de la digesta,
  - vi. Retirada de la alimentación durante un período inferior a 24h en ratas adultas,
  - vii. Ensayos en campo abierto.



## 2. Moderado:

- a) Aplicación frecuente de sustancias de prueba que producen efectos clínicos moderados, y extracción de muestras de sangre (> 10 % de volumen circulante) en un animal consciente en el plazo de algunos días sin reemplazo del volumen;
- b) Estudios de determinación de la gama de dosis causante de toxicidad aguda, pruebas de toxicidad crónica/carcinogenicidad, con puntos finales no letales;
- c) Cirugía bajo anestesia general y analgesia apropiada, asociada con dolor o sufrimiento posquirúrgicos o alteración posquirúrgica de la condición general. Los ejemplos incluyen: toracotomía, craneotomía, laparotomía, orquidectomía, linfodectomía, tiroidectomía, cirugía ortopédica con estabilización efectiva y cuidado de heridas, trasplante de órganos con tratamiento efectivo del rechazo, implantación quirúrgica de catéteres, o dispositivos biomédicos (por ejemplo, transmisores de telemetría, minibombas, etc.);
- d) Modelos de inducción de tumores, o tumores espontáneos, que se prevé que causen dolor o angustia moderados o interferencia moderada con el comportamiento normal;
- e) Irradiación o quimioterapia con una dosis subletal, o con una dosis que de otro modo sería letal, pero con reconstitución del sistema inmunitario. Cabría esperar que los efectos nocivos fueran leves o moderados y que fueran efímeros (< 5 días);
- f) Cría de animales genéticamente modificados que se espera den lugar a un fenotipo con efectos moderados;
- g) Producción de animales genéticamente modificados mediante procedimientos quirúrgicos;
- h) Uso de jaulas metabólicas que impliquen una restricción moderada de movimientos durante un período prolongado (hasta 5 días);
- i) Estudios con dietas modificadas que no cubren las necesidades nutricionales de todos los animales y que se espera que causen una anomalía clínica moderada en el período de estudio;
- j) Retirada de la alimentación durante 48 horas en ratas adultas;
- k) Provocar reacciones de escape y evitación en las que el animal no pueda escapar o evitar el estímulo, y que se espera que den lugar a una angustia moderada.

## 3. Severo:

- a) Ensayos de toxicidad en los que la muerte sea el punto final o se prevean muertes y se provoquen situaciones fisiopatológicas intensas. Por ejemplo, ensayo de toxicidad aguda con una única dosis (véanse las directrices de la OCDE sobre ensayos);
- b) Ensayos de dispositivos en los que el fracaso pueda causar dolor o angustia severos o la muerte del animal (por ejemplo, dispositivos de reanimación cardiaca);
- c) Ensayo de potencia de una vacuna caracterizada por la alteración persistente del estado del

- animal, enfermedad progresiva que causa la muerte, asociada con dolor, angustia o sufrimiento moderados duraderos;
- d) Irradiación o quimioterapia con una dosis letal sin reconstitución del sistema inmunitario, o reconstitución con la producción de enfermedad de injerto contra huésped;
  - e) Modelos con inducción de tumores, o con tumores espontáneos, que se espera causen enfermedad mortal progresiva asociada con dolor, angustia o sufrimiento moderados duraderos. Por ejemplo, tumores que causan caquexia, tumores óseos invasivos, tumores que dan lugar a diseminación metastásica, y tumores que se permite que se ulceren;
  - f) Intervenciones quirúrgicas y de otro tipo en animales bajo anestesia general que se espera den lugar a dolor, sufrimiento o angustia postoperatorios severos, o moderados pero persistentes, o a una alteración severa y persistente de la condición general del animal. Producción de fracturas inestables, toracotomía sin analgesia adecuada, o traumatismo para producir el fallo multiorgánico;
  - g) Trasplante de órgano donde es probable que el rechazo del órgano origine angustia o la alteración severa del estado general del animal (por ejemplo, xenotrasplante);
  - h) Reproducción de animales con trastornos genéticos que se espera experimenten una alteración severa y persistente de su estado general, por ejemplo la enfermedad de Huntington, distrofia muscular, modelos de neuritis crónicas recurrentes;
  - i) Uso de jaulas metabólicas que impliquen una restricción severa de los movimientos durante un período prolongado;
  - j) Choque eléctrico ineludible (por ejemplo para producir invalidez inducida);
  - k) Aislamiento completo durante períodos prolongados de especies gregarias, por ejemplo perros y primates no humanos;
  - l) Inmovilización de ratas para inducirles úlceras gástricas o fallo cardíaco por estrés;
  - m) Natación forzada o pruebas de ejercicio con el agotamiento como punto final.

#### **Artículo 16: Reutilización**

1. Los Estados miembros velarán por que un animal ya utilizado en uno o más procedimientos pueda utilizarse de nuevo en otro procedimiento, cuando pudiera utilizarse también otro animal nunca antes sometido a un nuevo procedimiento, siempre que se cumplan las condiciones siguientes:

- a) la severidad de los procedimientos anteriores era «leve» o «moderada»;
- b) se ha demostrado la recuperación total del estado de salud general y del bienestar del animal;
- c) el nuevo procedimiento está clasificado como «leve», «moderado» o «sin recuperación», y
- d) se ajusta al dictamen veterinario teniendo en cuenta la experiencia durante la vida del animal.

2. En circunstancias excepcionales, no obstante lo dispuesto en la letra a) del apartado 1, y previo

examen veterinario del animal, la autoridad competente podrá autorizar la reutilización de un animal siempre que dicho animal no haya sido utilizado más de una vez en un procedimiento que le haya provocado angustia y dolor severos o un sufrimiento equivalente.

Como el centro objeto del proyecto va a contar con el perro y los primates no humanos como animales de experimentación hay que destacar lo que marca la legislación en cuanto a la identificación de estos animales.

### **Artículo 32: Marcado e identificación de perros, gatos y primates no humanos**

1. Todo perro, gato o primate no humano deberá llevar, a más tardar desde el momento de su destete, una marca de identificación individual permanente aplicada de forma que cause el menor daño posible.
2. Cuando un perro, gato o primate no humano sea trasladado de un criador, suministrador o usuario a otro, antes de su destete, y no sea posible marcarlo previamente, el receptor deberá conservar un registro, con indicación, en particular, de los datos de la madre, hasta que sea marcado.
3. Cuando un perro, gato o primate no humano no marcado, destetado, sea recibido por un criador, suministrador o usuario, deberá ser marcado lo antes posible de forma permanente y del modo menos doloroso posible.
4. A solicitud de la autoridad competente, el criador, suministrador o usuario comunicará las razones por las que un animal no está marcado.

Continuando la línea proteccionista, destacan los artículos 46 y 49, que tratan sobre la repetición de investigaciones y la necesidad de crear un Comité Nacional que evalúe el bienestar animal.

### **Artículo 46: Evitar repeticiones de procedimientos**

Los Estados miembros aceptarán datos que se hayan obtenido en otros Estados miembros mediante procedimientos reconocidos por la legislación de la Unión, a no ser que deban realizarse otros procedimientos en relación con los datos en cuanto a la protección de la salud y seguridad públicas o del medio ambiente.

### **Artículo 49: Comité nacional para la protección de animales utilizados con fines científicos**

1. Cada Estado miembro establecerá un comité nacional para la protección de animales utilizados con fines científicos, encargado de asesorar a las autoridades competentes y a los órganos encargados del bienestar de los animales, en cuestiones relacionadas con la adquisición, cría, alojamiento, cuidado y utilización de animales en procedimientos, así como de garantizar que se comparten las mejores prácticas.
2. Los comités nacionales a que se refiere el apartado 1 intercambiarán información sobre el funcionamiento de los órganos encargados del bienestar de los animales y la evaluación de proyectos

y compartirán las mejores prácticas en la Unión.

Dentro de los Anexos que aparecen en esta Directiva, es necesario conocer el I:

## **ANEXO I: LISTA DE LOS ANIMALES A QUE SE REFIERE LA DIRECTIVA**

1. Ratón (*Mus musculus*)
2. Rata (*Rattus norvegicus*)
3. Cobaya (*Cavia porcellus*)
4. Hámster sirio (dorado) (*Mesocricetus auratus*)
5. Hámster enano chino (*Cricetulus griseus*)
6. Jerbo de Mongolia (*Meriones unguiculatus*)
7. Conejo (*Oryctolagus cuniculus*)
8. Perro (*Canis familiaris*)
9. Gato (*Felis catus*)
10. Todas las especies de primates no humanos
11. Rana [*Xenopus (laevis, tropicalis)*, Rana (*temporaria, pipiens*)]
12. Pez cebra (*Danio rerio*)

### **2.2. Normativa de España**

Actualmente en nuestro país las actividades relacionadas con la experimentación animal se rigen por dos normas, el Real Decreto 1201/2005 y la Ley 32/2007 para el Cuidado de los Animales. El **Real Decreto 1201/2005**, del 10 de Octubre, *sobre la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos*, se publicó en el B.O.E y fue elaborado por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA). Consta de 6 capítulos, 28 artículos, disposiciones: adicionales, transitoria y finales, y por último, 13 anexos. En su gran mayoría, los artículos recogen la misma información que la Directiva europea, pero se resaltan algunas cuestiones importantes.

Con respecto al manejo y condiciones de alojamiento:

#### **Artículo 4: Condiciones generales de alojamiento y manejo**

1. Los centros o establecimientos previstos en este real decreto deberán cumplir los siguientes requisitos en relación con el cuidado general y alojamiento de los animales de experimentación:
  - a) Que a los animales se les proporcionen unas condiciones adecuadas de alojamiento, medio ambiente, cierto grado de libertad de movimientos, alimentación, bebida y cuidados que

aseguren su salud y bienestar.

- b) Que se limite al mínimo imprescindible cualquier restricción que les impida satisfacer sus necesidades fisiológicas y etológicas.
- c) Que las instalaciones y las condiciones ambientales en las que se críen, mantengan, custodien o se utilicen los animales de experimentación les garanticen un adecuado nivel de bienestar y que ello se verifique diariamente.
- d) Que se disponga de medidas, medios e instalaciones que garanticen la eliminación, en el plazo más breve posible, de cualquier deficiencia que provoque alteraciones en el estado de salud o bienestar de los animales, con las alarmas necesarias.
- e) Que las normas de trabajo e instrucciones de uso de todos los elementos consten por escrito.
- f) Que tengan previsto por escrito un plan de actuación en caso de emergencia o catástrofe.
- g) Que se evite el acceso al interior de las instalaciones de personal no autorizado.
- h) Que el bienestar y la salud de los animales sean supervisados por el personal competente definido en el anexo I, para prevenir el dolor, así como el sufrimiento, la angustia o el daño duraderos.

2. Los establecimientos o centros deben cumplir lo establecido en el anexo II, así como la normativa vigente sobre las explotaciones ganaderas que les sea aplicable.

3. Los centros usuarios deben disponer, además, de instalaciones adecuadas para la realización de necropsias, toma de muestras y pruebas sencillas de diagnóstico.

4. El manejo de los animales de experimentación se realizará de acuerdo con el anexo III, sin perjuicio de la normativa vigente en materia de conservación de las especies naturales y de la fauna y flora silvestres.

Este R.D. especifica claramente la formación que debe poseer el personal para poder trabajar en centros con animales de experimentación.

#### **Artículo 9: Personal de los centros**

1. Las personas que lleven a cabo procedimientos o tomen parte en ellos y las personas que estén al cuidado de animales utilizados en procedimientos, incluyendo las tareas de supervisión, deberán tener la preparación y la formación adecuada, acreditada mediante la posesión de un título académico que haya sido considerado adecuado a estos efectos por la autoridad competente. Este personal estará encuadrado en una de las categorías profesionales descritas en el anexo I.

2. En cada centro se designará una persona responsable del cuidado de los animales y del funcionamiento de los equipos.

3. El responsable del centro se asegurará del cumplimiento de lo dispuesto en el apartado anterior.

4. El responsable del centro se asegurará del cumplimiento de la normativa sobre organismos genéticamente modificados cuando esta sea de aplicación.

La formación que debe tener cada trabajador dependiendo de su puesto se especifica en el anexo I.

#### **ANEXO I: Personal competente para trabajar en los centros**

Se definen cuatro categorías profesionales, que se clasifican de la siguiente forma:

**A. Personal de la categoría A:** personal para el cuidado de los animales. Los programas de enseñanza para esta categoría incluirán como mínimo:

1. Conceptos básicos relativos a los aspectos éticos y normativos de los cuidados proporcionados a los animales de experimentación.
2. Manipulación y mantenimiento de los animales:
  - a) Medio ambiente, equipos, jaulas y accesorios en las instalaciones para los animales: descripción, utilización y mantenimiento.
  - b) Manipulación y contención de los animales.
  - c) Conocimientos básicos sobre los métodos de eutanasia humanitaria de las especies afectadas.
  - d) Elementos generales de fisiología y de comportamiento de las especies animales utilizadas con fines experimentales.
  - e) Mantenimiento de los animales y, en caso necesario, cría de éstos.
  - f) Verificación de las condiciones medioambientales en los animalarios.
3. Reconocimiento del estado de salud y de las enfermedades:
  - a) Higiene y control de las enfermedades.
  - b) Elementos de fisiología general y de comportamiento de las especies animales utilizadas con fines experimentales.
4. Reconocimiento del dolor, el sufrimiento y la angustia.
5. Normativa referente a la seguridad, la administración, el transporte, la recepción, el aprovisionamiento de animales y la eliminación de los cadáveres.
6. Formación específica, en caso necesario, para todo trabajo de asistencia durante los procedimientos.

**B. Personal de la categoría B:** personal que lleva a cabo los procedimientos. Los programas de enseñanza para esta categoría incluirán como mínimo:

1. Conocimientos básicos apropiados sobre el mantenimiento de los animales y acerca de la normativa sobre la seguridad, la administración, el transporte, la recepción y el aprovisionamiento de animales y la eliminación de los cadáveres.

2. Conceptos básicos relativos a los aspectos éticos y normativos de los cuidados proporcionados a los animales de experimentación.
3. Manipulación y principios básicos del mantenimiento de los animales:
  - a) Características biológicas, en particular, fisiológicas y del comportamiento, de las especies, razas y líneas de los animales, de acuerdo con las tareas que se vayan a cumplir.
  - b) Manipulación y contención de los animales.
  - c) Métodos de eutanasia humanitaria de las especies afectadas.
4. Reconocimiento del estado de salud y de las enfermedades: aspectos prácticos del seguimiento del estado de salud y de las enfermedades.
5. Implicaciones del estatus microbiológico de los animales.
6. Reconocimiento del dolor, el sufrimiento y la angustia.
7. Formación apropiada para la realización de los procedimientos. En la medida en que sea necesario para las tareas que se vayan a realizar:
  - a) Apreciación de los elementos que se deben tener en cuenta desde la concepción de un procedimiento, incluyendo el refinamiento, la reducción y el reemplazo.
  - b) Importancia del sistema de alojamiento y del ambiente inmediato de los animales para los procedimientos.
  - c) Anatomía de los animales utilizados para fines experimentales.
  - d) Anestesia, analgesia y apreciación de la necesidad de poner fin al procedimiento para reducir lo más posible los sufrimientos del animal.
  - e) Técnicas apropiadas e intervenciones quirúrgicas. El programa de formación del personal de categoría B debe tener un importante componente práctico, aspecto este último que se llevará a cabo bajo la supervisión de una persona con amplia experiencia en los aspectos estudiados.

**C. Personal de la categoría C:** personal responsable para dirigir o diseñar los procedimientos. Se considerará que los científicos responsables del diseño y de la dirección de procedimientos son competentes cuando:

1. Sean titulados superiores con nivel equivalente a una licenciatura en una disciplina como la Biología (animal), la Medicina, la Veterinaria u otra disciplina con formación adecuada en zoología, anatomía y fisiología.
2. Hayan participado en un curso básico sobre la ciencia de los animales de laboratorio, con el fin de desarrollar un nivel de responsabilidad apropiado para un uso de los animales de acuerdo con las normas científicas de alto nivel, cuyo programa incluya como mínimo:

- a) Aspectos éticos y legislación.
- b) Biología y mantenimiento de los animales de experimentación.
- c) Microbiología y enfermedades.
- d) Diseño de procedimientos con animales.
- e) Anestesia, analgesia y procedimientos experimentales.
- f) Alternativas al uso de animales.
- g) Análisis de la literatura científica apropiada.

**D. Personal de la categoría D:** personal especialista en ciencias del animal de experimentación con funciones de asesoramiento sobre el bienestar de los animales.

1. Personal especialista en bienestar animal: persona con titulación universitaria superior en el área de Ciencias de la Salud, encargada de supervisar y asesorar todos los aspectos relacionados con el bienestar de los animales.
2. Personal especialista en salud animal: persona licenciada en Veterinaria con formación complementaria especializada en animales de experimentación, encargada de supervisar y asesorar todos los aspectos relacionados con la salud de los animales.

Otro de los puntos a estudiar es el registro necesario para abrir un estabulario. Se recoge en el artículo 12.

#### **Artículo 12: Registro de los centros de cría, suministradores y usuarios**

1. Los centros o establecimientos privados, con carácter previo al inicio de su funcionamiento, deberán ser autorizados por la autoridad competente.
2. Una vez obtenidos todos los permisos, autorizaciones o licencias exigibles por la normativa vigente, ningún nuevo establecimiento podrá iniciar su actividad sin estar registrado y haber recibido el correspondiente código de identificación.
3. Los centros o establecimientos públicos, con carácter previo al inicio de su funcionamiento, deberán ser inscritos en el registro habilitado para ello.
4. Se crea en el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación el Registro de los centros de cría suministradores y usuarios de animales de experimentación, de carácter público e informativo, en el cual se inscribirá directamente todo centro o establecimiento de titularidad estatal.

En el Anexo IX podemos ver toda la documentación necesaria para proceder al registro.



## **ANEXO IX: Documentación mínima requerida para la inscripción de los centros en el registro**

1. Solicitud que contenga los siguientes datos:
  - a) Nombre del centro.
  - b) Dirección completa.
  - c) Titular del centro, nombre y, si procede, razón social y número de código de identificación fiscal o número de identificación fiscal.
  - d) Tipo de establecimiento (cría, suministrador o usuario).
2. Informe que contenga, como mínimo:
  - a) Memoria descriptiva y planos o croquis de situación, distribución de las construcciones, instalaciones y dependencias, así como la capacidad en número de animales y actividades que en él se prevé que van a desarrollar.
  - b) Programa higiénico-sanitario que prevea todas las medidas de control establecidas por la normativa vigente.
  - c) Memoria descriptiva de los aspectos fundamentales de los procedimientos que se prevé realizar, especies y número de animales que se críen, suministren o utilicen.
  - d) Informes técnico y sanitario. El informe sanitario estará suscrito por el especialista en salud animal.
  - e) Identificación del responsable administrativo del centro.
  - f) Identificación del responsable del bienestar de los animales.
  - g) Identificación del veterinario responsable de la salud de los animales.
  - h) Relación del personal especializado, con especificación de su formación, titulación y experiencia. En el caso de centros usuarios universitarios y centros públicos de investigación, únicamente se inscribirá la relación del personal para el cuidado de los animales, el personal especialista en bienestar animal y el especialista en salud animal.
  - i) Cuando se trate de un centro usuario de titularidad estatal, se inscribirá, además, la composición del comité.

Con respecto al registro de los propios animales dentro del centro, se debe conocer los Anexos V y VI.

#### **ANEXO V: Datos mínimos para la identificación en las jaulas o sistemas de confinamientos**

- a) Especie.
- b) Raza (en su caso).
- c) Cepa (en su caso).
- d) Sexo.
- e) Fecha de nacimiento.
- f) Fecha de cruce (si son parejas).
- g) Número de animales.
- h) En los centros usuarios, en su caso, investigador responsable del procedimiento en el que están siendo utilizados los animales, departamento al que este está adscrito y código de identificación del procedimiento.
- i) Observaciones.

#### **ANEXO VI: Datos mínimos del libro de registro de los animales en los centros**

Todos los centros deben llevar un registro de los animales en el cual deben anotarse los siguientes datos:

- a) El nombre y el número de registro del centro.
- b) El número de animales presentes en el centro en el momento de abrir este registro, indicando la especie o especies a que pertenecen.
- c) Las entradas de los animales, la fecha en que se producen, indicando la especie, los nacimientos y las compras, haciendo constar su origen (con mención del nombre y dirección del centro criador o suministrador).
- d) Las salidas de los animales, la fecha en que se producen y la especie, haciendo constar su destinatario (con mención del nombre y dirección del destinatario).
- e) Los animales sacrificados o muertos no utilizados en procedimientos, y sus causas, y, en su caso, el método de sacrificio utilizado.
- f) Los animales utilizados en procedimientos, indicando a qué procedimiento están destinados.
- g) Las observaciones efectuadas durante el período de cuarentena de los animales que provienen del exterior del centro.
- h) Los resultados de los exámenes sanitarios efectuado a los animales.
- i) Los resultados de las necropsias realizadas.
- j) Los casos de enfermedad y los tratamientos administrados.

- k) En el caso de los animales criados, suministrados o utilizados en procedimientos, de especies en que reglamentariamente esté establecido, se hará constar la identificación individual de cada animal.
- l) Se harán constar los datos referentes al origen y la identificación individual de perros, gatos y primates no humanos.
- m) En los centros que críen animales de especies ganaderas para las cuales sea obligatorio la existencia y mantenimiento de un libro de registro, será de aplicación la normativa vigente en este ámbito.

Este R.D. obliga a todos los centros a constituir Comités Éticos de Experimentación Animal que valoren la idoneidad de los procedimientos a realizar y los aprueben o rechacen. Los artículos que se centran en describir como formar estos Comités y sus funciones son el 22, 23 y 24. Posteriormente a la publicación de este Real Decreto la normativa europea se actualizó y entre algunos de los cambios estaba precisamente este punto, la obligatoriedad de crear Comités Éticos, cosa que en nuestro país ya se producía.

#### **Artículo 22: Creación de los Comités Éticos de Bienestar Animal**

- 1. En los centros usuarios de titularidad estatal existirá un comité ético de bienestar animal (en adelante, «el comité»), el cual debe velar por el cumplimiento de lo establecido en el artículo 11 y el capítulo IV.
- 2. El comité se dotará de un reglamento interno que defina y desarrolle, en su ámbito, sus integrantes y su funcionamiento básico según criterios de confidencialidad y representatividad, y que garantice la imparcialidad en sus decisiones.

#### **Artículo 23: Composición**

- 1. El comité debe estar integrado por un mínimo de tres personas con la experiencia y los conocimientos necesarios para velar por el bienestar y el cuidado de los animales. Los miembros que, como mínimo, deben formar parte de estos comités serán los siguientes:
  - a) El especialista en bienestar animal del centro.
  - b) Un representante de la unidad de garantía de calidad del centro, cuando exista, o, en su defecto, un investigador del centro no directamente implicado en el procedimiento
  - c) que deba informarse.
  - d) Una persona con experiencia y conocimientos en bienestar de los animales que no tenga relación directa con el centro o con el procedimiento de que se trate.
- 2. En cualquier caso, deben estar constituidos por personas ajenas al procedimiento evaluado.
- 3. Los miembros respetarán el principio de confidencialidad.

4. Cuando se considere oportuno, solicitarán el asesoramiento de personas expertas que no pertenezcan al comité, las cuales también respetarán el principio de confidencialidad.

#### **Artículo 24: Funciones**

Las funciones del comité son las siguientes:

- a) Informar de la idoneidad de cada procedimiento en relación con los objetivos del estudio, la posibilidad de alcanzar conclusiones válidas con el menor número posible de animales, la consideración de métodos alternativos a la utilización de los animales y la idoneidad de las especies seleccionadas.
- b) Informar de que cada procedimiento se lleva a cabo ajustándose a la memoria descriptiva notificada o aprobada a que se refieren los anexos XII y XIII.
- c) Informar sobre la realización de los procedimientos, en especial de que:
  1. Se ponen los medios para que los animales no sufran innecesariamente y para que se les proporcionen, cuando sea necesario, analgésicos, anestésicos u otros métodos destinados a eliminar al máximo el dolor, el sufrimiento o la angustia.
  2. Se utilizan métodos de eutanasia adecuados a la especie animal y al procedimiento que se realice.
  3. El personal que participa en los procedimientos tenga la formación adecuada para llevar a cabo las tareas que se le encomiende.

En lo que respecta a la Ley 32/2007, se centra en el cuidado de los animales en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio, y está encaminada a la protección de los animales utilizados en investigación pero no únicamente en este campo. Esta Ley pretende completar el Real Decreto que regula directamente la experimentación animal. Intencionadamente, se elaboró de modo muy general para abarcar el mayor abanico de aspectos posibles y evitar dejar vacíos legales. Por ello, en varios artículos se hace referencia al cumplimiento de la regulación sobre experimentación animal sin concretar en esos aspectos. Las principales novedades que incluye esta ley son prohibiciones, infracciones y sanciones. La falta de estos tres aspectos había hecho imposible sancionar hasta aquel momento a las personas o instituciones que no cumplieran con lo marcado en el Real Decreto. Entre otras cosas, la Ley señala como infracción muy grave la liberación incontrolada y voluntaria de animales de experimentación y también marca la cuantía de las sanciones en relación con la infracción cometida.

### 2.3. Normativa de la Comunidad Valenciana

En lo que se refiere a nuestra comunidad, es el **Decreto 13/2007** del 26 de enero del Consell el que regula la protección de los animales de experimentación. Está compuesto por 5 capítulos, 12 artículos junto con las disposiciones adicionales y transitorias. Analizando el texto, no tiene ningún punto que lo diferencie del Real Decreto y, de hecho, es un texto escueto que en muchas ocasiones deriva directamente al R.D. 1201/2005.

### **3. FISIOLOGÍA Y MANTENIMIENTO DE LAS ESPECIES DE EXPERIMENTACIÓN:**

En este apartado se definirán las condiciones para albergar a diferentes especies de experimentación, exponiendo sus peculiaridades, sus necesidades fisiológicas y el espacio requerido para su alojamiento según la legislación. Únicamente se incluirá la información reproductiva con su consecuente manejo en las fichas técnicas del ratón y la rata por ser las únicas especies en las que está prevista la cría en el propio animalario.

#### **3.1. Listado de animales de experimentación susceptibles de ser alojados en el estabulario**

Roedores:

- Ratón (*Mus musculus*)
- Rata (*Rattus norvegicus*)
- Hámster sirio (*Mesocricetus auratus*)
- Cobaya (*Cavia porcellus*)

Lagomorfos:

- Conejo (*Oryctolagus cuniculus*)

Primates no humanos:

- Macaco de cola larga (*Macaca fascicularis*)

Carnívoros:

- Perro (*Canis familiaris*)

Grandes animales:

- Cerdo (*Sus scrofa*)
- Oveja (*Ovis aries*)
- Cabra (*Capra hircus*)

### 3.2. Fichas Técnicas

#### Roedores:

##### Ratón (*Mus musculus*):

Empezaron a utilizarse en biomedicina a finales del siglo XIX, por su pequeño tamaño, su fácil manejo, su variabilidad genética y su alta tasa reproductiva. En la actualidad existen más de 1000 cepas genéticamente definidas que se emplean en investigación.

#### a) Reproducción:

Los machos alcanzan la madurez reproductiva entre las 6 y las 8 semanas y mantienen la fertilidad durante toda la vida. En el laboratorio las hembras alcanzan la madurez en torno a la semana 7 o 8 y su vida sexual fértil se prolonga hasta los 13-14 meses de vida. Las hembras son políestricas con un ciclo de 4-5 días de duración.

Los eventos más importantes en la vida sexual del ratón ocurren durante la noche, o en el período de oscuridad dentro de los ciclos de oscuridad programados. La monta puede durar entre 10 minutos y 1 hora, aunque la ovulación sea espontánea se necesita el estímulo de la cópula.

La forma de confirmar que se ha producido la monta es la presencia de un tapón mucoso en la vagina de la hembra, formado por las secreciones de las glándulas accesorias del macho y las secreciones vaginales, que perdurará durante unas 6-12 horas. Este tapón se encarga de asegurar un entorno idóneo para la supervivencia de los espermatozoides y además evita que la hembra sea fecundada por otro macho. A partir de los 11-12 días tras la monta se puede verificar la gestación por palpación de los embriones en los cuernos uterinos y por el aumento de peso evidente en torno al día 14 tras el servicio.

La gestación del ratón dura entre 18 y 19 días en las hembras primíparas y 19-21 días en múltiparas, dependiendo del estado fisiológico de la hembra. Hay que tener presente que cuando una hembra gestante entra en contacto con un macho genéticamente distinto en los primeros días de gestación se puede producir el **efecto Bruce**, por el cual la hembra detiene la gestación de forma prematura. Es por esto se debe evitar poner en contacto hembras preñadas con machos o con cama contaminada con orina como mínimo durante los 5 primeros días tras la monta.

Todo el proceso del parto puede durar en torno a unas dos horas y en general cada hembra pare entre 4 y 8 crías aunque depende del estado sanitario y de la constitución genética de la madre. El ratón hembra tiene un comportamiento maternal excepcional y se ocupa de las crías de forma meticulosa desde el nacimiento hasta el destete, aunque también se han registrado comportamientos anómalos como el abandono o que devore a las crías. Una vez comienza la lactación, el estímulo de

succión por parte de las crías es necesario para que la madre produzca leche, la lactación dura entre 19 y 21 días. Es interesante saber que en ocasiones varias madres alternan sus servicios y cuidados en un nido común, por ello se podrán practicar adopciones para estandarizar camadas: deben hacerse cuanto antes mejor e intentando que las crías adoptadas adquieran el olor de la cama y de las otras crías para evitar el rechazo de la madre.

Las crías nacen con los ojos y oídos cerrados, la piel sin pelo y muy fina, casi transparente. A los 2 o 3 días del nacimiento el color de la piel adquiere una tonalidad clara y se les despegan las orejas. A la semana se les cubre el cuerpo con un fino pelaje. Hacia los 10-12 días erupcionan los incisivos superiores e inferiores y unos tres días después abren los ojos. El sexado de las crías se puede realizar por observación de la zona perianal: se debe evaluar la distancia entre la papila genital y la apertura anal, siendo esta distancia mucho mayor en machos. A partir del día 14 se produce el descenso de los testículos en los machos lo que facilita el sexado. El destete se produce en torno al día 21 y será el momento ideal para separar las crías por sexos y dejar que se establezcan las jerarquías dentro de los nuevos grupos.

Para el diseño de los sistemas de cruce tenemos varias alternativas según la productividad que queramos conseguir. En el sistema **monogámico** se junta a un macho con una única hembra lo que favorece el control de la producción. En el sistema **poligámico** se mantiene permanentemente un macho con dos hembras en la misma cubeta y ambas madres cuidarán de todas las crías simultáneamente. Y por último en el sistema **harén** se junta un macho con más de dos hembras: las hembras son separadas antes del parto y se devuelven a la cubeta con el macho tras el destete, de esta forma se consigue un mayor número de hembras en cruce y un mejor control de las camadas por separado. Este último sistema es el de mayor producción y además saca partido del **efecto Whitten**, que consiste en que cuando un grupo de hembras alojadas juntas entra en contacto con un macho o con su olor se logra la sincronización de sus ciclos estrales y la mayoría estarán receptivas al tercer día del contacto.

Teniendo en cuenta las características del centro objeto de este proyecto, y que en principio su función principal no es la de servir animales a otros centros, con el sistema monogámico sería suficiente para cubrir las necesidades de animales.

b) Estabulación:

Los ratones deben ser alojados en jaulas con suelo sólido, a no ser que sea un requisito indispensable del experimento que el suelo sea perforado. Estos animales se encuentran incómodos en ese tipo de superficies con agujeros por lo que no suelen criar. El lecho debe ser absorbente, atóxico y en cantidad suficiente para permitir que los animales lo manipulen. Independientemente del tipo de jaula, deben mantenerse grupos estables siempre que sea posible, evitando tanto el hacinamiento como los grupos muy reducidos, el hacinamiento puede provocar pérdida de la fertilidad y aumento de la mortalidad en crías. De variar los grupos, habrá que intentar identificar signos de





### Rata (*Rattus norvegicus*):

Comenzaron a utilizarse a mediados del siglo XIX, proceden de la rata noruega salvaje. Existen gran cantidad de cepas no consanguíneas y muchas más consanguíneas que permiten ajustar el tipo de animal al estudio que vayamos a realizar.

#### a) Reproducción:

El proceso reproductivo de la rata es similar al del ratón en muchos aspectos, aunque se debe tener en cuenta que no se produce el **efecto Bruce** y la sincronización del ciclo estral cuando pones a un grupo de hembras en contacto con un macho o su olor no es tan marcada. La membrana vaginal se abre a las 5 semanas de vida y alcanzan la madurez sexual a las 6-8 semanas de vida. En la rata también se produce el tapón mucoso posterior a la monta igual que en el ratón. Con respecto al reconocimiento del estro, algunos de los comportamientos indicativos del mismo son el temblor de las orejas, frotamientos de cabeza y espalda, nerviosismo y lordosis al acariciarlas. A la hora de juntarlas con el macho podemos seguir cualquiera de las tres estrategias comentadas para los ratones, sistema monógamo, polígamo o en harén.

Una vez se acerca el momento del parto aumentará la conducta de acicalamiento por parte de la hembra, estas lamidas parecen activar la producción y secreción de leche. Cuando el parto es inminente se produce una secreción vaginal transparente. El tamaño de la camada suele variar de 10 a 15 crías aunque depende mucho de la línea genética con la que estemos tratando.

La velocidad de crecimiento de las crías es muy similar a la descrita en ratones, el destete también se produce en torno al día 21 por lo que el manejo reproductivo a seguir es prácticamente el mismo que en ratones, será tras el destete cuando deberemos separar las crías y agruparlas por sexos. Con respecto a las madres, las hembras tienen un gran instinto maternal, pueden llegar a aceptar crías de otras camadas siempre que estén en buen estado y no haya demasiada diferencia temporal con sus propias crías. De todas formas se aconseja, igual que en el ratón, frotar las crías adoptadas con la cama y con las demás crías para que adquieran el olor. Se ha demostrado que el parto no es necesario para que la hembra demuestre comportamiento maternal, se ha visto que crías nacidas por cesárea son atendidas por la madre poco tiempo después de despertarse de la anestesia.

#### b) Estabulación:

Las ratas deben ser alojadas en las mismas condiciones que los ratones, es decir, con suelo sólido, cama absorbente y no tóxica y en cantidad suficiente para que les permita manipularla. En cuanto a la densidad, debemos evitar ambos extremos, los animales no deben estar ni hacinados ni alojados individualmente.

c) Dimensiones de los alojamientos según el R.D. 1201/2005:

Superficie mínima del suelo de la jaula: 350 cm<sup>2</sup>

Altura: 14 cm

Superficie mínima del suelo de la jaula por madre y su prole: 800 cm<sup>2</sup>

Altura: 14 cm

d) Dieta (comida y agua):

El régimen más habitual es *Ad libitum*. El pienso más apropiado es el específico para roedores de laboratorio. Con respecto al agua, puede suministrarse por medio de un biberón o por un sistema de bebida automático, aunque este último es mucho más costoso y complejo.

e) Manejo:

Las ratas son animales dóciles y de fácil manipulación. Debemos evitar la brusquedad o realizar movimientos muy rápidos al manipularlas, sobretodo si vamos a apoyarlas en una superficie enrejillada ya que esto favorece la rotura de uñas. En caso de que el animal muestre un excesivo nerviosismo podemos taponarle la cabeza con un trapo lo que la tranquilizará.

Para sacarla de la jaula podemos pasar la palma de la mano por debajo de su vientre o directamente sujetarla de la base de la cola. Debemos tener en cuenta con esta última práctica que el animal puede intentar girarse y morder la mano que sujeta la cola.

Para sexar las ratas se debe proceder igual que en ratón, observando la distancia entre la papila genital y la apertura anal, siendo esta distancia mayor en machos, no obstante, a partir del día 14 los testículos han descendido por lo que se identifica el sexo fácilmente.

Para la inmovilización de la rata existen varias técnicas, se puede colocar una mano alrededor del pecho con el pulgar situado bajo el mentón y el índice alrededor del cuello asegurando la cabeza con firmeza, la otra técnica consiste en agarrar con una mano el gran pliegue de piel en la zona entre la espalda y el cuello. En la rata, al igual que en el ratón, para inyecciones intraperitoneales el animal debe estar con el abdomen hacia arriba y la colocación de la cabeza hacia abajo disminuirá el riesgo de pinchar en alguna víscera.

Para la administración por vía oral por medio de una sonda, el animal se sujeta por ambos carrillos, agarrando en un pellizco la piel de la cara y la oreja lo que imposibilita que mueva la cabeza y facilita la verticalidad del esófago. Cuando se introduce la sonda debemos medir la distancia, hasta la apófisis xifoides del esternón, si no llega tan abajo puede que esté situada en el tracto respiratorio. Nunca se debe intentar la administración oral en animales sedados o anestesiados debido a que tienen deprimido el reflejo de deglución.

Para inmovilizar al animal e inyectar por vía subcutánea se pueden utilizar cilindros de contención, hechos de plástico que aseguran que el animal esté quieto, aunque hay que tener en cuenta que esta práctica conlleva un elevado nivel de estrés en el animal.

f) Peculiaridades anatómicas y fisiológicas:

La anatomía de la rata y el ratón son en general muy similares pero con ligeras diferencias. Las ratas carecen de vesícula biliar y además no pueden regurgitar ni vomitar por lo que son muy sensibles a la acción de tóxicos. También es destacable la presencia de las glándulas de Harder, situadas detrás del globo ocular, que producen una secreción de color marrón rojizo que lubrica el ojo. En estados de malestar, por ejemplo, en una situación de estrés crónico en ocasiones se observan lágrimas rojizas al rededor de los ojos y la nariz que al secarse parecen sangre. Por lo tanto, esta señal es uno de los muchos medidores del bienestar que existen.

Hámster sirio (*Mesocricetus auratus*):

Este animal comenzó a utilizarse en experimentación por los años 30. En la actualidad su empleo es muy reducido, en torno al 1%.

a) Estabulación:

El hámster será alojado en unas condiciones muy similares al ratón, con suelo sólido, cama absorbente y no tóxica y en cantidad suficiente para que les permita manipularla, que tengan la posibilidad de manipular el sustrato es especialmente importante en esta especie puesto que tienen un gran instinto de nidificación. En cuanto a la densidad, los animales no deben estar ni hacinados ni en grupos muy reducidos.

b) Dimensiones de los alojamientos según el R.D. 1201/2005:

Superficie mínima del suelo de la jaula: 180 cm <sup>2</sup>	Altura: 12 cm
Superficie mínima del suelo de la jaula por madre y su prole: 800 cm <sup>2</sup>	Altura: 12 cm

c) Dieta (comida y agua):

El régimen más habitual es *Ad libitum*. El pienso más apropiado es el específico para roedores de laboratorio. Con respecto al agua, puede suministrarse por medio de un biberón o por un sistema de bebida automático, aunque este último es mucho más costoso y complejo.

d) Manejo:

Los hámsters son animales muy nerviosos y no deben manipularse hasta estar seguros de que han detectado la presencia del investigador. Para sacarlos de la jaula se debe acercar las manos al nivel de su vista, nunca desde arriba, para pasar la mano por debajo de su vientre, o sujetarlos con ambas manos ahuecadas. En el caso de que sean agresivos será necesario utilizar unos guantes gruesos para protegernos o unas pinzas para cogerlos del pliege cutáneo del cuello. Para inmovilizarlos hay que sujetar con firmeza dicho pliege de forma similar a la descrita para la rata.

e) Peculiaridades anatómicas y fisiológicas:

El hámster se caracteriza por tener dos abazones o bolsas bilaterales que forman parte de sus carrillos, las utilizan como almacén de comida o para transportar a sus crías.

Son animales solitarios que habitualmente deben ser alojados de forma individual. En este sentido, las hembras pueden ser más agresivas que los machos. En condiciones de temperatura de 6°C o menos, falta de alimento o fotoperíodos inferiores a 8 horas de luz entran en estado de hibernación. Durante este estado su temperatura corporal, frecuencia respiratoria y cardíaca disminuyen notablemente aunque en hibernación alternan períodos de sueño de 2 o 3 días con períodos de actividad de unas 12 horas por lo que será necesario que dispongan de agua y alimento. Aunque a este respecto lo más adecuado es que nunca lleguen a entrar en hibernación.

Con respecto a su tolerancia a fármacos, es destacable que son menos sensibles a la morfina y al pentobarbital en comparación con el resto de roedores. Algunos antibióticos, como la penicilina, eritromicina y tetraciclina, pueden producirles una enterotoxemia ya que alteran el balance entre bacterias gram + y gram – del intestino. Con respecto a los corticoides, son más sensibles a su efecto. Con la histamina ocurre lo contrario, es difícil provocarles un shock anafiláctico al tener una respuesta frente a esta bastante atenuada.

Cobaya (*Cavia porcellus*):

Estos animales comenzaron a utilizarse en experimentación a principios del siglo XX. En la actualidad su uso es reducido, pero se han estado utilizando sobretudo en la producción y control de sueros y vacunas y en estudios de enfermedades infecciosas por su alta susceptibilidad a las mismas.

a) Estabulación:

Como el resto de roedores, requieren que el suelo sea sólido y liso para cubrirlo con cama absorbente y no tóxica y en cantidad suficiente para que les permita manipularla. En cuanto a la densidad, los animales no deben estar ni hacinados ni en grupos muy reducidos.

b) Dimensiones de los alojamientos según el R.D. 1201/2005:

Superficie mínima del suelo de la jaula: 600 cm <sup>2</sup>	Altura: 18 cm
Superficie mínima del suelo de la jaula por madre y su prole: 1200 cm <sup>2</sup>	Altura: 18 cm

c) Dieta (comida y agua):

El régimen más habitual es *Ad libitum*. El pienso más apropiado es el específico para cobayas. Las diferencias en alimentación con el resto de roedores se deben principalmente a que no son capaces de sintetizar la vitamina C, por este motivo y para que no aparezcan deficiencias, deben

añadirse 100 mg/Kg de peso vivo de ácido ascórbico y unos 200 mg/L de vitamina C en el agua de bebida, aunque en la actualidad esos aditivos ya se encuentran en los piensos específicos para cobayas. Como medida casera, se puede suministrar 50 gramos diarios de col, aunque lo más funcional es comprar un pienso con el balance hecho. Con respecto al agua, a parte de lo ya comentado de la vitamina C, puede suministrarse por medio de un biberón o por un sistema de bebida automático.

d) Manejo:

Los cobayas son animales muy nerviosos y escurridizos. El manipulador debe aproximarse con una mano por delante del animal y con la otra por detrás para bloquear su huída. La mejor opción es sujetarlo con una mano con firmeza alrededor de los hombros y del tórax y utilizar la otra mano para que apoye el tercio posterior. Son animales muy delicados, no es conveniente sostenerlos con excesiva firmeza ya que su zona dorsal del tronco es muy sensible, podrían sufrir un shock o lesiones pulmonares. También hay que tener en cuenta que si se caen de las manos a una altura considerable muy probablemente sufran alguna fractura. A pesar de sus grandes dientes no suelen morder, en ocasiones de mucho estrés se quedan rígidos y gritan. Por todos estos motivos es fundamental que el manipulador esté experimentado al tratar con estos animales.

e) Peculiaridades anatómicas y fisiológicas:

Son animales sociales y muy activos durante el día, por ello se recomienda alojarlos en grupos. Vocalizan con mucha frecuencia, son apacibles y muy sensibles al frío y al calor. Condiciones de elevadas temperaturas con una deficiente renovación del aire los predisponen a sufrir enfermedades respiratorias como neumonías.

Una de las diferencias con el resto de roedores es que son herbívoros exclusivamente. Mezclan el agua con el alimento en la boca por lo que al comer depositan parte de esa mezcla en los comederos. Se debe intentar que los comederos no estén a ras de suelo porque suelen defecar en ellos.

Estos animales son muy sensibles a *Bordetella*. Si en la instalación va a alojar conejos, como precaución debemos limpiar después de la estancia de los conejos y no alojarlos juntos por el riesgo de contagio.

Con respecto a la farmacología, presentan una gran reacción frente a la histamina, que a veces puede ocasionarles la muerte. Son más sensibles a los antibióticos que los hámsteres, el uso de eritromicina y penicilina está contraindicado por poder causarles la muerte. No obstante, los corticoides no les producen ningún efecto.

### Parámetros aplicables a todos los roedores:

#### a) Temperatura y humedad relativa:

La temperatura y la humedad relativa son parámetros muy importantes en la estabulación de estos animales, los cambios de temperatura pueden generar cambios en el metabolismo, en la circulación y en el comportamiento de los roedores pudiendo alterar los resultados experimentales. Soportan mejor las bajas temperaturas, con temperaturas superiores a 32° C pueden sufrir muerte súbita, esto se debe a las dificultades que tienen para disipar el calor al carecer de glándulas sudoríparas, no jadear y tener la superficie corporal cubierta de pelo. Por eso llevan a cabo comportamientos como el enterramiento o el recubrimiento del cuerpo con saliva. La zona óptima de temperatura que marca la legislación es de 20-24 °C. Con respecto a la humedad relativa, su variación extrema puede generar diversas patologías. Una elevada HR favorece el aumento de la concentración de amoníaco en las jaulas que puede ser responsable de procesos patológicos en el tracto respiratorio. Una HR demasiado baja aumenta el consumo de alimentos y afectará en mayor medida a los animales jóvenes. Lo recomendable es que la HR se encuentre entre el 50 y el 70%.

#### b) Tasa de renovación del aire:

Para controlar la calidad del aire, debemos tener en cuenta que este no debe contener sustancias aromáticas o pesticidas de ningún tipo. El sistema de ventilación debe diseñarse para evitar que haya corrientes de aire directamente sobre los animales pero que al mismo tiempo asegure una tasa de renovación del aire de unas 15-20 renovaciones por hora.

#### c) Ruido:

El ruido es otro factor estresante que se debe controlar ya que los roedores son sensibles a los ruidos. Por lo general, los sonidos constantes y de baja frecuencia son menos traumáticos que los intermitentes y de alta frecuencia. No solo influye la intensidad, también la duración, el tiempo de exposición y la posibilidad de nuevas exposiciones. Las consecuencias de exposiciones excesivas a ruido pueden ser daños en el oído, hipertensión, alteración del peso corporal y de la respuesta inmune, canibalismo, fallos reproductivos, etc. La legislación indica que los alojamientos de los animales no deben tener ruidos superiores a 50 dB.

#### d) Iluminación:

Con respecto a la luz y el sistema de iluminación, el fotoperíodo indicado para los roedores es de 12 horas de luz y 12 de oscuridad, aunque también podría ser 14 horas de luz y 10 de oscuridad. Con respecto a la iluminación se recomienda utilizar fluorescentes de 350-400 lux de intensidad.

#### e) Identificación y transporte:

Todas las especies de roedores descritas pueden englobarse en esta sección puesto que las condiciones de transporte e identificación son las mismas para todos ellos.

Con respecto a la identificación, no es necesaria el marcado individual de cada uno de los animales, la información que deberá aparecer en el registro de animales del centro y en la etiqueta de la jaula aparece especificada en los ya nombrados ANEXO V y ANEXO VI del R.D. 1201/2005.

El transporte de los roedores suele realizarse en cajas de distintos materiales como plástico o cartón que, a su vez, pueden dividirse en compartimentos para así albergar diferentes grupos. Las cajas deben disponer de ventanas de observación y agujeros cubiertos por una fina malla en la tapa y paredes que garanticen la suficiente ventilación. Dentro de la caja debe haber cama y comida de transporte, que consiste en una sustancia gelatinosa que suple al mismo tiempo las necesidades de comida y de líquido por un máximo de 48 horas.

No es aconsejable el transporte de hembras gestantes, madres con camadas muy recientes o grupos de machos adultos que no se conocieran previamente. Debemos evitar el transporte durante días de mucho calor o mucho frío.

## **Lagomorfos:**

### Conejo (*Oryctolagus cuniculus*):

El conejo es utilizado como animal de experimentación mucho menos que los roedores, tradicionalmente se ha utilizado en proyectos de reproducción, oftalmología o en producción de anticuerpos. Con mucha diferencia, la raza de conejos más utilizada es la New Zealand White, que es una estirpe albina. En el laboratorio estos animales se suelen usar con pocos meses de vida y se intentan mantener con un peso que ronde los 4 a 5 Kg en los adultos.

#### a) Estabulación:

Los conejos de laboratorio se mantienen en jaulas de acero inoxidable con suelos de tipo slat de plástico agujereado. Se prefiere la utilización de material plástico porque el metal origina heridas con mayor facilidad, además, este tipo de rejillas plásticas facilita mucho la limpieza. Es conveniente proporcionar en el interior de la jaula un lugar elevado sólido donde los conejos puedan estar, aunque obviamente esto no siempre es posible, pues requiere unas jaulas de mayor altura. Debemos intentar evitar el aislamiento de los animales, aunque en el caso de los machos sí es aconsejable debido a su agresividad pero las hembras generan muchos menos problemas. El nivel de agresividad entre los animales será menor cuanto mayor sea el espacio disponible y cuantas más herramientas de enriquecimiento ambiental estén presentes dentro de la jaula, como por ejemplo lugares para esconderse, juguetes u objetos que llamen su atención, material para nidificar o bloques de alfalfa que puedan manipular. Todo este enriquecimiento ayuda a evitar la ingesta de pelo por parte de los animales, que puede provocar la formación de bolas en el estómago que bloqueen el tránsito intestinal. Con estos objetos también evitaremos el sobrecrecimiento de los incisivos ya que tendrán



materiales que roer.

b) Dimensiones de los alojamientos según el R.D. 1201/2005:

Superficie mínima del suelo de la jaula:		Altura:
Conejo 1 Kg	1.400 cm <sup>2</sup>	30 cm
Conejo 2 Kg	2.000 cm <sup>2</sup>	30 cm
Conejo 3 Kg	2.500 cm <sup>2</sup>	35 cm
Conejo 4 Kg	3.000 cm <sup>2</sup>	40 cm
Conejo 5 Kg	3.600 cm <sup>2</sup>	40 cm

c) Dieta (comida y agua):

El régimen de alimentación típico es *ad libitum*. Existen en el mercado piensos para conejos de laboratorio, que se caracterizan principalmente por tener un alto contenido en fibra. El pienso se puede suplementar con vegetales como zanahorias, manzanas o bloques de alfalfa siempre que no interfieran en la investigación para la que se usan los conejos, como ya hemos comentado, estos elementos también realizarán la función de entretenimiento para los animales. El aporte de agua se hace por medio de biberones o redes de agua automáticas.

d) Temperatura y humedad relativa:

El rango de temperatura idónea es de 15 a 21° C y la HR entre el 40 y el 70%.

El sistema de ventilación debe asegurar un mínimo de 15-20 renovaciones de aire por hora. En el caso del conejo, es especialmente importante una buena ventilación debido al elevado contenido en urea de su orina, ésta acaba descomponiéndose formando amoníaco. A parte de la renovación del aire, la retirada de las deyecciones tiene gran importancia para prevenir los problemas respiratorios.

e) Ruido:

El conejo es un animal muy asustadizo por lo que se recomienda no superar los 50 dB en los alojamientos.

f) Luz e iluminación:

Un fotoperíodo adecuado para el conejo son 12 horas de luz y 12 de oscuridad. Con respecto a la iluminación se recomienda utilizar fluorescentes de 350-400 lux de intensidad.

g) Manejo:

Por norma general los conejos son animales dóciles y fáciles de manejar, aunque pueden ponerse nerviosos ante la presencia humana. Para sacarlos de la jaula conviene acercarse a ellos con movimientos pausados evitando ruidos o tonos de voz elevados. El comportamiento normal es

que el animal se arincone en la esquina más alejada del investigador y que intente evitar el contacto. Se puede utilizar una mano para agarrarlo de la piel de la parte trasera del cuello y el dorso y rápidamente se coloca el otro brazo bajo su abdomen a la vez que con la mano libre se agarran las extremidades posteriores dándole así un punto de apoyo. Para moverlo fuera de la jaula se recomienda acercarse al animal al propio manipulador, e introducir la cabeza del animal entre el codo y el torso del investigador tal forma que con el brazo se bloquee su visión. Así el conejo se tranquilizará. Sea cual sea la técnica de sujeción, es muy importante que no sienta las extremidades posteriores libres porque la primera reacción del animal será el pataleo que puede conllevar arañazos al manipulador y en algunas ocasiones fracturas lumbares para el conejo, lo que sería motivo inmediato de eutanasia.

Para inmovilizarlos en la mesa de trabajo, existen diversos tipos de cepos rígidos en los cuales se introduce al animal y se ajusta a su tamaño para que no tengan opción de movimiento. La cabeza queda fija, dejando un fácil acceso a las orejas, de donde se podrán realizar extracciones sanguíneas por las venas marginales y la arteria central de la oreja. Como alternativa a estos cepos, se puede utilizar un trapo o toalla ya que si el animal se revuelve hay menos probabilidades de que se dañe. Para acceder a la zona abdominal hay que sujetar al animal con una mano por el pliegue cutáneo del cuello y con la otra mano sujetar las extremidades posteriores colocándolo boca arriba.

#### h) Peculiaridades anatómicas y fisiológicas:

Los conejos no son roedores, presentan 4 incisivos superiores y unas orejas muy desarrolladas con una estructura vascular de fácil acceso. Con respecto a su aparato digestivo, tienen un ciego de gran tamaño. Los conejos son muy sensibles a las disbiosis intestinales y, al igual que las ratas, tampoco tienen la capacidad de vomitar.

Soportan altos niveles de deshidratación. Su estructura ósea es débil, hecho que se agudiza con las condiciones de estabulación donde realizan muy poco ejercicio físico, por eso la importancia de una delicada manipulación.

Una peculiaridad muy importante de los conejos es la práctica de la cecotrofia, por la cual aprovechan mejor la dieta, y no debe confundirse con la coprofagia que es un indicativo de desnutrición, entre otras cosas. La cecotrofia se inicia en torno al destete y consiste en la producción e ingestión de cecotrofos o heces blandas, ricas en agua proteína microbiana, vitaminas y oligoelementos. Esta práctica únicamente se produce en estados de tranquilidad y sosiego de los animales, en caso de estrés se reduce llegando a inhibirse completamente.

#### i) Identificación y transporte:

A parte de la información pertinente en la etiqueta de la jaula no es necesario el marcado individual de estos animales, pero puede realizarse por medio de sistemas de tatuado o crotales. Para el transporte de los conejos, la caja debe tener espacio suficiente para permitir el movimiento pero no

demasiado, ya que esto podría provocar alguna fractura como consecuencia de un movimiento brusco del transporte. Es muy recomendable colocar un buen lecho de paja en el fondo de la caja y debemos evitar los cambios bruscos de temperatura durante el transporte. Para desplazamientos cortos una caja de cartón con agujeros que aseguren la ventilación será suficiente. Eso sí, siempre hay que asegurarse de que la caja esté bien cerrada ya que los conejos son expertos saltadores.

### **Primates no humanos:**

#### Macaco de cola larga (*Macaca fascicularis*):

Dentro de todas las especies de primates no humanos con las que se trabaja, ésta es la más utilizada en investigación. No alcanza un gran tamaño, cuando son adultos el peso máximo ronda los 7 u 8 Kg lo que los hace más fácilmente manipulables que otros primates. Esta especie puede llegar a vivir hasta los 25-30 años. Existen centros de cría en cautividad en Europa y EEUU aunque la mayoría de los animales provienen de criaderos de Asia.

#### a) Estabulación:

Este tipo de animales suele alojarse en jaulas de acero inoxidable por las necesidades de espacio que precisan. Este tipo de jaulas están diseñadas para poder disponer de repisas o lugares donde los animales puedan sentarse a una altura superior a la del suelo de la jaula. A la hora de proporcionarles más espacio, conviene que éste sea en vertical. En caso de ser posible, la mejor opción es estabularlos con acceso a un patio exterior, aunque normalmente esta opción no está al alcance de la mayoría de centros de experimentación. Deben ser agrupados en parejas, en grupos reducidos o individualmente aunque disfrutan de la compañía de sus congéneres. Debemos tener muy en cuenta la jerarquización de los grupos a la hora de alojarlos. Una forma sencilla de comprobar los roles dentro de esa jerarquía es ver qué animal controla el acceso a la comida. Por tanto, hay que comprobar que las luchas jerárquicas no son tan graves como para que los animales salgan dañados o no puedan alimentarse correctamente. La falta de estímulos, ya que no tienen que buscar su propia comida, y la de espacio pueden generar la aparición de comportamientos anómalos como las estereotipias, que son comportamientos repetitivos. Todo esto es corregible cuando se aportan elementos de enriquecimiento ambiental como juguetes u objetos manipulables dentro de las jaulas, contacto con el personal o juegos de alimentación que requieran de la participación del primate.

b) Dimensiones de los alojamientos según el R.D. 1201/2005:

Peso del primate en Kg	Superficie mínima del suelo de la jaula para uno o dos animales en m <sup>2</sup>	Altura mínima de la jaula en cm
<1	0,25	60
1 a 3	0,35	75
3 a 5	0,5	80
5 a 7	0,7	85
7 a 9	0,9	90

c) Dieta (comida y agua):

Estos animales tienen una dieta muy diversa, por eso la mejor forma de alimentarlos es el pienso específico para primates, que se puede suplementar con fruta fresca. La dosis de pienso dependerá del peso del animal. El sistema de bebida puede ser tipo biberón o uno automático.

d) Temperatura y humedad relativa:

La temperatura óptima para estos animales oscila entre 20 y 24 °C. La HR debe encontrarse entre el 40 y el 70%. El sistema de ventilación debe asegurar un mínimo de 15 renovaciones del aire por hora.

e) Ruido:

Se recomienda no superar los 50 dB en los alojamientos.

f) Luz e iluminación:

Estos primates se rigen por un fotoperíodo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad. Con respecto a la iluminación se recomienda utilizar fluorescentes de 350-400 lux de intensidad.

g) Manejo:

Únicamente el personal entrenado debe poder acceder a estos animales. Para algunas manipulaciones los animales pueden ser entrenados para que colaboren, pero por norma general será necesaria la inmovilización. Actualmente, muchas de las jaulas disponen de una pared retráctil lo que facilita el acceso al animal. La mayor parte de manipulaciones consistirán en la administración de sustancias, por vía oral, intramuscular o endovenosa, y extracciones de sangre u otras muestras. En cuanto a las administraciones orales, siempre podemos intentar enmascarar el fármaco con zumos o golosinas. Para inoculaciones endovenosas, la vena safena externa es muy accesible o, en su defecto, los vasos de la cola, particularmente accesibles en esta especie, ya que se caracteriza por su

larga cola.

h) Identificación y transporte:

Según el Artículo 32 de la Directiva 2010/63/UE ya comentado, se debe marcar individualmente a estos animales, de forma permanente y lo más indolora posible, a más tardar tras el destete. Para el transporte de primates la caja debe posibilitar el movimiento, tendrá una ventana de observación y debe impedir cualquier contacto que no sea visual del animal con el exterior. Dentro tendremos que colocar fruta fresca e intentar que, siempre que sea posible, se transporten por parejas a no ser que sean machos adultos, en cuyo caso es recomendable transportarlos de forma individual.

**Carnívoros:**

Perro (*Canis familiaris*):

Destaca por ser un animal curioso y altamente social. De las muchas razas de perros que existen, el más utilizado en experimentación es el Beagle. Alcanza un peso medio de unos 10-12 Kg. Está terminantemente prohibido experimentar con perros vagabundos.

a) Estabulación:

Se pueden alojar tanto en espacios cerrados como al aire libre, lo ideal es alojarlos en grupos pequeños y que dispongan de una zona cubierta y de un espacio al aire libre. Los cercados cubiertos deben tener una zona, no necesariamente muy extensa, con suelo de rejilla para facilitar la limpieza. Deben disponer de una zona para dormir que esté seca y aislada de la zona de estancia. La parte exterior debería disponer de algo de inclinación para favorecer el drenaje. De forma eventual, se pueden utilizar jaulas para alojar a los perros, pero siempre y cuando el experimento así lo requiera y la estancia en jaula no deberá prolongarse más de lo estrictamente necesario, el suelo de la jaula debemos intentar que no sea de rejilla, por la incomodidad que produce en los animales. Si están en jaula o en un recinto no muy grande debemos asegurarles un mínimo de media hora al día de ejercicio en una zona de paseo amplia donde el animal disponga de libertad de movimientos. En el caso de este animal, el enriquecimiento ambiental es conocido por todos, juguetes, objetos que morder o el simple contacto con otros perros y con los cuidadores permitirán que los animales desarrollen todo su abanico de comportamientos.

A la hora de realizar los grupos de alojamiento habrá que tener en cuenta que los machos muestran mayor agresividad entre ellos, que en todo momento el manipulador tiene que ser el dominante de la manada y que los posibles problemas de agresividad se corrigen con la actividad junto al criador o reagrupando a los animales más conflictivos. Si trabajamos con hembras habrá que tener en cuenta que dos veces al año, una en otoño y otra en primavera, estarán activas sexualmente

y alterando a todos los machos que estén cerca. Esto puede tener diversas soluciones, desde esterilizar a los animales, hasta trabajar únicamente con uno de los sexos. Todo ello dependerá de las condiciones de los estudios que los requieran y de cómo estas alteraciones podrían modificar los resultados.

b) Dimensiones de los alojamientos según el R.D. 1201/2005:

Perros alojados en cercado:

Peso del perro en Kg	Superficie mínima del suelo del cercado por perro en m <sup>2</sup>	Superficie mínima adyacente exterior por perro	
		Hasta 3 perros por m <sup>2</sup>	Más de 3 perros por m <sup>2</sup>
<6	0,5	0,5	0,5
6 a 10	0,7	1,4	1,2
10 a 20	1,2	1,6	1,4
20 a 30	1,7	1,9	1,6

Perros alojados en jaula:

Altura del perro a la cruz en cm	Superficie mínima del suelo de la jaula por perro en m <sup>2</sup>	Altura mínima de la jaula en cm
30	0,75	60
70	1	60
75	1,75	140

c) Dieta (comida y agua):

Los adultos deben alimentarse una vez al día, con pienso seco o húmedo, la dosificación nos la indicará el fabricante. En el caso de los cachorros, es preferible dosificar la comida en varias tomas. En el caso de alojar a los animales en grupos es necesario asegurarse de que todos los animales acceden a la comida de forma suficiente. Con respecto al agua, deben tener acceso a ella permanentemente, ya sea mediante bebederos o por medio de un sistema automático de bebida.

d) Temperatura y humedad relativa:

Los perros no se aclimatan bien a las bajas temperaturas. Su rango óptimo es entre 15 y 21° C. La HR debe estar entre el 40 y el 60% y la tasa de renovación del aire debe asegurar entre 10 y 15 renovaciones por hora para evitar olores aunque hay que asegurarse que los animales no tienen corrientes de aire directamente sobre ellos.

e) Ruido:

Se recomienda no superar los 50 dB en los alojamientos. Hay que tener en cuenta que los perros son sensibles a ruidos de alta frecuencia, lo que puede provocar alteraciones físicas y comportamentales que pueden acabar modificando los resultados experimentales.

f) Luz e iluminación:

La luz debe ser uniforme y lo suficientemente intensa como para permitir la inspección rutinaria y la limpieza, pero sin ser excesiva. Un fotoperíodo aceptable para el perro se compone de 12 horas de luz y 12 de oscuridad. Con respecto a la iluminación se recomienda utilizar fluorescentes de 350-400 lux de intensidad.

g) Manejo:

Por norma general los perros son tranquilos, sobre todo los Beagle. Uno debe acercarse de cara al animal moviéndose despacio y hablando al mismo tiempo con un tono sosegado. El silencio puede generar tensión. Además se recomienda acariciar a los perros con frecuencia para que estén acostumbrados al contacto. Es importante que las técnicas experimentales no se lleven a cabo en el alojamiento del animal, sino en un lugar adecuado para ello.

Si el animal se muestra excesivamente nervioso o agresivo podemos utilizar un bozal con lo que evitamos los mordiscos. Si persiste esta actitud en un individuo en concreto habrá que valorar la idoneidad de ese animal para la investigación.

Para inmovilizar a un perro la mejor forma es tumbarlo en decúbito lateral, sujetando las dos extremidades que están en contacto con la mesa impidiendo que pueda levantarse, el brazo que sujeta la extremidad anterior debe colocarse a la altura del cuello del animal ejerciendo más presión e impidiendo que mueva la cabeza.

Para inspeccionar la cavidad bucal se debe rodear la boca con la mano suavemente, si se presiona sobre la dentadura el animal abrirá la boca, hay que colocar siempre los belfos entre los dedos y los dientes del animal para evitar que muerda. En el caso de querer medir la temperatura corporal se introducirá un termómetro impregnado en vaselina por el recto del perro, la temperatura normal ronda los 37'5 °C. La forma de tomarle el pulso a un perro es colocando dos dedos de la mano (ninguno de los cuales puede ser el pulgar) en la cara interna del muslo hasta que se localiza la arteria femoral, entre 60 y 80 pulsaciones sería lo normal pudiendo llegar a 120 en estados de

extrema inquietud.

En el caso de que se quiera administrar pastillas o líquidos, se puede mezclar con comida para engañar al animal. Para las pastillas, si no las acepta, habrá que introducirle la pastilla en la base de la lengua y cerrarle la boca masajeando la zona traqueal para que trague. En el caso de que haya que administrarle gotas en los oídos, habrá que colocar al perro sentado y se desplaza la oreja hacia atrás y hacia arriba para facilitar la entrada y precipitación del líquido por el conducto auditivo. Posteriormente la zona de la base de la oreja debe ser masajeada para favorecer el progreso del líquido. Estas son algunas de las técnicas más básicas que existen para manipular al perro.

h) Identificación y transporte:

Al igual que los primates, los perros deben ser marcados individualmente, de forma permanente y lo más indolora posible, a más tardar tras el destete, ya sea por medio de microchip, tatuaje u otros medios. Los contenedores para transportar perros pueden ser de materiales como fibra de vidrio, metal, plástico rígido, etc. Las puertas deben ser de materiales similares y de una sola pieza corredera o con bisagras. Si el contenedor tiene ruedas deberán bloquearse durante el transporte. El transportín suele ser individual, requiriendo espacio suficiente para que el animal pueda sentarse erecto, tumbarse o poder darse la vuelta. Debe tener agujeros o rendijas que permitan la ventilación. Con respecto a los animales, no es recomendable transportar a hembras en estro ni a cachorros durante o justo después de la lactación. Si el viaje va a ser inferior a 12 horas no es necesario suministrarles agua ni comida durante el transporte, en el caso de que sea un viaje más largo, sí es obligatorio el suministro de agua y comida.

**Grandes animales:**

Cerdo (*Sus scrofa*):

El cerdo es utilizado en experimentación debido a que presenta muchas similitudes anatómicas y fisiológicas con el humano. Se trata de un mamífero monogástrico y omnívoro muy social e inteligente. En investigación se utilizan frecuentemente variedades más pequeñas en tamaño (micropigs) que se han desarrollado mediante cruzamientos selectivos a partir del cerdo doméstico. Se utilizan en gran diversidad de investigaciones y también en el aprendizaje y adquisición de destreza en técnicas quirúrgicas, durante los últimos años se han usado en el transplante de órganos y tejidos y en los avances en xenotransplantes. No obstante, el número de cerdos utilizados en investigación es inferior al 0,1% de la población total de cerdos.



a) Estabulación:

Los cerdos deben alojarse separados por sexos. En el caso de ser machos enteros tienen que vivir separados individualmente, aunque tengan contacto visual, olfativo y sonoro con otros animales. Tanto las hembras como los machos castrados pueden alojarse en grupos, dentro de los cuales se establecerá una jerarquía. Hay que observar que no haya ningún animal excesivamente castigado dentro de los grupos, así como que todos acceden a la comida. La forma de alojarlos puede ser en jaula o en un cercado. Cuando se mantengan en jaula será porque es indispensable para el objetivo del experimento y no podrán estar en esa situación más de lo estrictamente necesario. El suelo de las jaulas no se recomienda que sea todo de rejilla. Con respecto a los cercados, deben tener una parte del suelo con rejilla o planchas tipo "slat" y otra parte lisa para que descansen.

Con respecto al enriquecimiento ambiental, los cerdos a parte de ser sociales son también curiosos, si se aburren mostrarán conductas anómalas como la caudofagia. Para evitar estos problemas se les pueden aportar objetos como cuerdas, neumáticos o incluso pelotas para que jueguen y se distraigan.

b) Dimensiones de los alojamientos según el R.D. 1201/2005:

Cerdos alojados en cercado:

Peso en Kg	Superficie mínima del suelo del cercado en m <sup>2</sup>	Longitud mínima del cercado en m	Altura mínima de las divisiones del cercado en m	Longitud mínima del comedero por cabeza en m
10 a 30	2	1,6	0,8	0,2
30 a 50	2	1,8	1	0,25
50 a 100	3	2,1	1,2	0,3
100 a 150	5	2,5	1,4	0,35
>150	5	2,5	1,4	0,4

#### Cerdos alojados en jaula:

Peso del cerdo en Kg	Superficie mínima del suelo de la jaula por cerdo en m <sup>2</sup>	Altura mínima de la jaula en cm
5 a 15	0,35	50
15 a 25	0,55	60
25 a 40	0,8	80

#### c) Dieta (comida y agua):

La comida puede administrarse en forma de gránulos, harina o pasta. Debe estar formulada para cubrir específicamente las necesidades nutricionales dependiendo de la edad del animal. También tendremos que tener en cuenta el sistema de alojamiento ya que animales que vivan en el exterior tendrán mayores requerimientos energéticos. El régimen alimenticio de los cerdos adultos suele ser restringido para evitar el sobrepeso, en cuyo caso también se recomienda aumentar la cantidad de fibra en la dieta. Según las Directrices Europeas, deben existir suficientes comederos por jaula y cercado para que todos los animales tengan acceso al alimento. Con respecto al agua, el acceso a ella debe ser constante ya sea por medio de bebederos o de boquillas automáticas.

#### d) Temperatura y humedad relativa:

Cuando son lechones tienen unos requerimientos de calor muy estrictos, ya que son muy sensibles al frío. La temperatura óptima de los adultos está entre 10 y 24° C con una HR del 40 al 60%. La ventilación debe ser la adecuada para permitir la eliminación de gases nocivos, pero sin que existan corrientes de aire, ya que los cerdos son muy sensibles a ellas y propensos a padecer enfermedades respiratorias. Con una tasa de renovación del aire de entre 15 y 20 renovaciones por hora es suficiente.

#### e) Ruido:

Se recomienda no superar los 50 dB en los alojamientos.

#### f) Luz e iluminación:

Para la iluminación, un fotoperíodo aceptable sería 12 horas de luz y 12 de oscuridad. Con respecto a la potencia se recomienda utilizar fluorescentes de 350-400 lux de intensidad.

#### g) Manejo:

El método para manejar a los cerdos depende de su edad. Los jóvenes de poco peso pueden ser cargados, colocando una mano y brazo bajo el cuerpo del animal mientras con la otra mano se sujeta la cabeza. El manejo de animales muy nerviosos requiere un especial cuidado pues pueden

hacer daño cuando muerden. Solo con sentir el contacto ya vocalizan sonidos fuertes y estridentes por lo que el manipulador debe estar preparado para ello.

Los machos adultos requieren mucha precaución puesto que pueden reaccionar de manera muy violenta. La socialización positiva y frecuente con humanos favorece su manejo. Para animales que puedan resultar peligrosos se recomienda la sedación antes de empezar a manipularlo. Para ello resulta útil sedar al animal dentro del propio corral mediante una jeringa acoplada a un tubo de plástico, una vez sedado solo habrá que esperar a que el sedante haga efecto para poder manipularlo.

#### Oveja (*Ovis aries*) y cabra (*Capra hircus*):

El número de ovejas y cabras utilizadas en experimentación animal es inferior al 0,2% con respecto a la población total. Pese a tener un gran tamaño para ser animales de experimentación, su carácter suele ser dócil y fácil de controlar.

##### a) Estabulación:

Tanto ovejas como cabras son animales gregarios, que se deben mantener en grupos. Son de carácter asustadizo y en el caso de los machos se recomienda utilizar animales castrados ya que en época reproductiva pueden volverse agresivos. Ambas especies pueden ser alojadas tanto en recintos interiores como exteriores. En el caso de estar en zona exterior es importante asegurar que tengan acceso a zona cubierta donde refugiarse. La elección del tipo de alojamiento depende de los medios de los que se disponga y del uso que se les vaya a dar a los animales. No es aconsejable en absoluto alojarlos individualmente, y si por las condiciones del experimento necesitamos que estén aislados, se utilizarán unos compartimentos donde puedan mantener contacto visual con otros individuos. Cuando se alojan en grupo es necesario un espacio que permita que todos los animales se puedan tumbar al mismo tiempo fácilmente. El suelo puede ser de rejilla o sólido, pero en todo caso debe ser de un material que evite los resbalones de los animales. En el caso de ser sólido, se suelen cubrir con paja, que debe ser cambiada con cierta frecuencia para asegurar que la cama esté limpia y seca, y de esta forma evitar la aparición de enfermedades podales y de enfermedades respiratorias por la acumulación de gases nocivos.

b) Dimensiones de los alojamientos según el R.D. 1201/2005:

Animales alojados en cercado:

Especie y peso en Kg	Superficie mínima del suelo del cercado en m <sup>2</sup>	Longitud mínima del cercado en m	Altura mínima de las divisiones del cercado en m	Longitud mínima del comedero por cabeza en m
Ovina < 70	1,4	1,8	1,2	0,35
Caprina < 70	1,6	1,8	2	0,35

Animales alojados en compartimento:

Especie y peso en Kg	Superficie mínima del compartimento en m <sup>2</sup>	Longitud mínima del compartimento en m	Altura mínima de las divisiones en los compartimentos en m
Ovina < 70	0,7	1	0,9
Caprina < 70	0,8	1	0,9

c) Dieta (comida y agua):

Ovejas y cabras se deben alimentar con heno de buena calidad, que proporcione la cantidad de fibra necesaria para asegurar el buen funcionamiento del rumen. También debemos suplementar el heno con pienso, teniendo en cuenta el estado fisiológico. Ambas especies deben tener acceso al agua potable *ad libitum*.

d) Temperatura y humedad relativa:

Ambas especies deben mantenerse en un rango de temperaturas entre 10 y 24° C. Con una HR de aproximadamente el 50 o 60%. La capacidad de ventilación de los locales debe asegurar un mínimo de unas 15 a 20 renovaciones de aire por hora. Hay que tener en cuenta que estos animales van a producir gran cantidad de amoníaco, monóxido de carbono y metano. El ideal sería mantener al NH<sub>3</sub> por debajo de 10 ppm, al CO por debajo de 150 ppm y el CH<sub>4</sub> por debajo de las 500 ppm.

e) Ruido:

Se recomienda no superar los 50 dB en los alojamientos.

f) Luz e iluminación:

Estos animales se rigen por un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Con respecto a la potencia, se recomienda utilizar fluorescentes de 350-400 lux de intensidad.

g) Manejo:

El hecho de que los animales entren en contacto con los manipuladores desde muy jóvenes facilitará las cosas. A la hora de sujetar a los animales, los jóvenes son menos conflictivos pero los adultos requieren más contundencia, con una mano bajo la barbilla del animal y la otra en el flanco. No deben ser agarrados de las orejas o cuernos, ni tampoco de la lana o del pelo. Para realizar procedimientos de corta duración los adultos pueden sentarse o tumbarse sobre uno de sus lados, para ello lo mejor es doblarle suavemente la cabeza hacia un lado con una mano bajo la barbilla mientras con la otra mano se empuja el costado en la dirección del suelo hasta que el animal se deja caer. Hay que fijarse que no se sienten sobre el rabo, ya que eso sería molesto, sino sobre un costado. En esta posición solo aguantarán unos minutos debido, entre otras cosas, al nerviosismo y a la acumulación de gas en el rumen. Para manipular carneros o machos cabríos tendremos que ser mucho más cautelosos porque pueden llegar a ser peligrosos.

Las pezuñas y los cuernos deben ser revisados regularmente, cortándolos siempre que sea preciso. En general, las pezuñas se suelen cortar unas 3 o 4 veces al año aunque la frecuencia dependerá del desgaste que tengan. De igual forma, las ovejas se deben esquila un mínimo de una vez al año, aunque esto va en función de si están en un recinto exterior o interior.

Parámetros aplicables a todas las especies de grandes animales:

- Identificación y transporte:

Los animales serán identificados individualmente de la misma manera que los grandes animales destinados a producción, es decir, mediante crotal en la oreja o tatuaje.

Para el transporte, en el caso del cerdo la duración máxima del trayecto es de 24 horas y dispondrán de agua continuamente. En lo que se refiere a todas las grandes especies, en los puntos de parada sólo puede haber simultáneamente animales de la misma especie encontrándose estos en la misma situación sanitaria certificada. Cuando un viaje dure más de ocho horas se debe suministrar alimentación, agua, ventilación y descanso a los animales. Con respecto a los vehículos, deben tener la capacidad para regular la temperatura en la zona de carga, de tal forma que se pueda ajustar dependiendo de las condiciones meteorológicas. No se recomienda el transporte de animales destetados recientemente o hembras próximas al parto.

Tanto por carretera como por ferrocarril, los animales deben poder tumbarse todos simultáneamente y también permanecer de pie en su posición natural. Es necesario tanto un techo de

protección como un suelo antideslizante que debe cubrirse por paja suficiente para absorber las deyecciones, no obstante, el techo debe estar a una altura por encima de los animales suficiente como para asegurar la ventilación.

## **4. DISEÑO DE LAS INSTALACIONES:**

### **4.1. Definición de las distintas áreas**

Es necesario separar a los animales del exterior, mediante elementos de obra y equipamiento técnico, que conformarán zonas protegidas de distinta complejidad. Las estancias interiores también se separarán según sus funciones. En general, se distinguen tres áreas con subdivisiones funcionales:

#### **4.1.1. Áreas de animales:**

Dentro de este grupo de localizaciones están los lugares donde se mantienen y/o crían los animales, donde se realizan experimentos con ellos y donde deben estar durante períodos prolongados de tiempo.

- a) Cuarentena: cumple una función básica en el animalario, debe separarse en distintas estancias con distintas funciones, una para recibir a los animales procedentes de otros centros y cerciorarnos de que están en un estado sanitario óptimo y otra para albergar a los animales propios que estén enfermos. Debido a su función, la zona de cuarentena debe estar separada del resto de áreas de animales, aunque también es necesario que tenga fácil acceso.
- b) Producción y cría: es el lugar destinado a albergar los animales elegidos como reproductores, así como las madres con sus crías durante la lactación. En este caso, como sólo se ha contado con criar ratones y ratas en el estabulario, el espacio requerido a tal fin no es excesivamente grande.
- c) Mantenimiento: son las distintas salas que van a albergar a los animales durante el desarrollo de los experimentos.
- d) Experimentación: las salas de experimentación albergarán todos los procesos que se realicen a los animales. Algunos sencillos como extracción de muestras sanguíneas, o medidas comportamentales se pueden realizar en una zona contigua a los alojamientos. Pero existen casos donde las salas de experimentación deben ser diseñadas específicamente, como es el caso de los quirófanos, que deben asegurar la mayor asepsia posible.

#### 4.1.2. Áreas de servicios:

Se corresponden con las dependencias del personal y los alumnos.

- a) Oficinas: es necesario contar con una zona administrativa que se situará cerca de la entrada principal del centro.
- b) Sala de reuniones: será necesario esta sala para la planificación y discusión, no solo del diseño de los experimentos por parte de los grupos investigadores, sino también de los horarios docentes por parte de los profesores responsables.
- c) Sala de descanso: contará con máquinas de autoservicio de café y aperitivos, así como de sofás y sillas.
- d) Aulas: necesarias para promover el espíritu docente del centro, estas aulas dispondrán de encerado, una mesa para el profesor con un ordenador, un proyector y pupitres para los alumnos. En estas clases los profesores realizarán las presentaciones explicativas previas a las prácticas que faciliten la comprensión de las técnicas a realizar y que ayuden al alumno a asentar los conocimientos.
- e) Laboratorios de investigación: a parte de las zonas donde se experimenta con los animales, serán necesarios otros laboratorios donde poder procesar las muestras, preparar los reactivos, comprobar la calidad de los piensos o llevar a cabo analíticas sencillas.
- f) Sala de necropsias: necesaria para detectar posibles problemas en nuestros animales. También será indispensable para los estudiantes de los primeros cursos debido a que en ella se llevarán a cabo las prácticas de anatomía en todo tipo de animales. La característica diferencial de esta sala es que es el lugar de mayor riesgo microbiológico potencial, por ello tendrá sus propios vestuarios con duchas y se encontrará al extremo del centro, en la zona del pasillo sucio. De esta forma se evita, en la medida de lo posible, la recirculación de patógenos por el interior de las instalaciones. Además, anexo a la sala de necropsias, pero fuera del edificio principal, se encontrará el contenedor de cadáveres, donde periódicamente recogerán los animales muertos sin necesidad de entrar dentro del recinto. El contenedor de cadáveres no debe tener ventanas, y estará compuesto por cámaras frigoríficas que mantengan los cadáveres a -20° C.
- g) Vestuarios: existirán dos vestuarios, uno masculino y otro femenino. Cada vestuario dispondrá de un lavamanos, taquillas y duchas. La peculiaridad de los vestuarios será su localización en la antesala de las áreas de animales, ya que estará terminantemente prohibido acceder a la zona de animales sin haber pasado antes por los vestuarios.



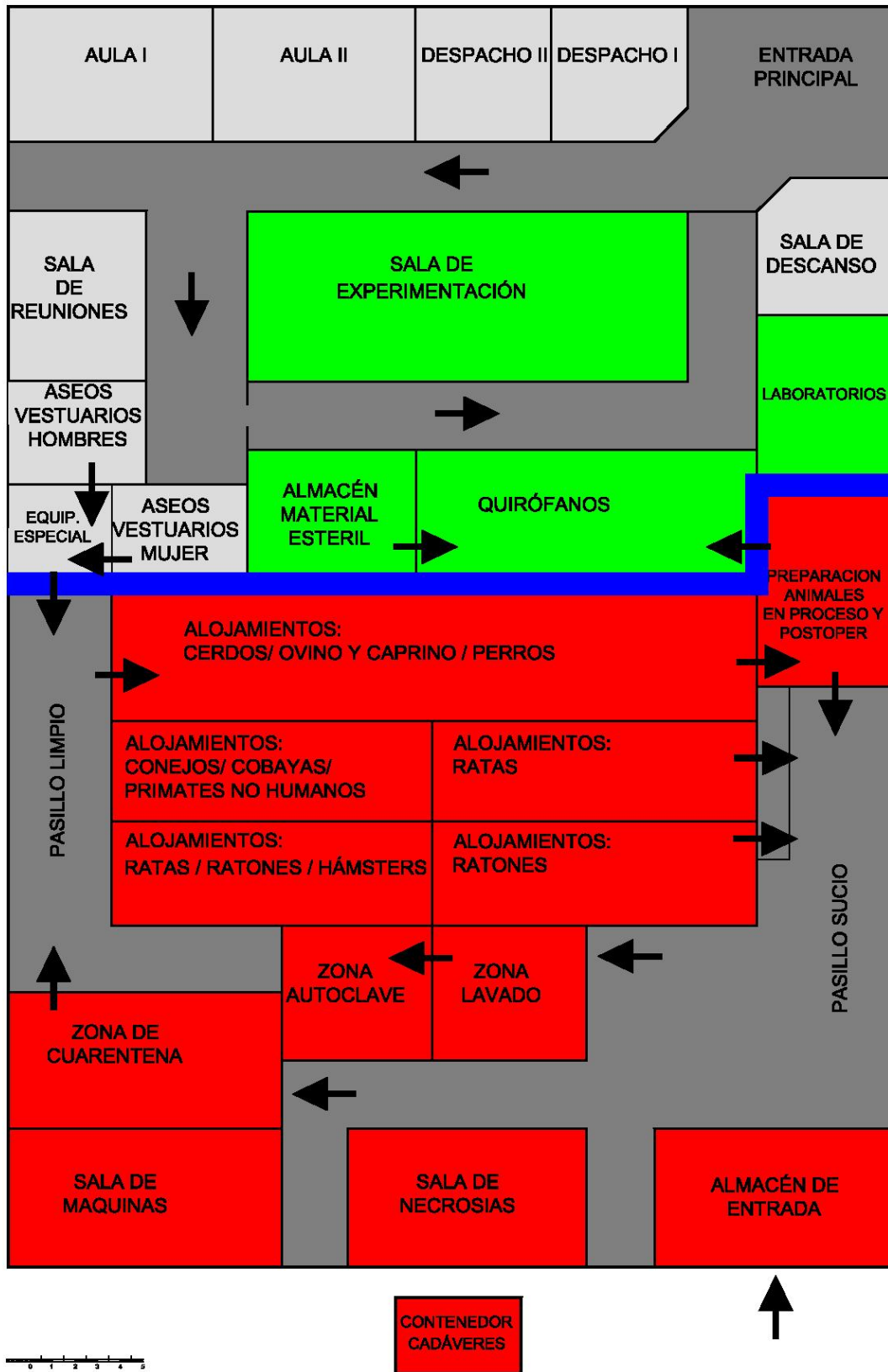
- h) Aseos: habrá dos, uno masculino y otro femenino, y estarán contíguos a los vestuarios para evitar la necesidad de entrar en la zona de experimentación si se requiere su utilización.
- i) Almacenes: los habrá de distintos tipos, de material de limpieza, de material quirúrgico y necesario para llevar a cabo las prácticas, de piensos y camas, etc. En el caso del de alimentos, también será necesario la instalación de frigoríficos para mantener dietas especiales o fruta fresca, por ejemplo. Todos los almacenes deberían ser espaciosos para permitir la reposición de los materiales que vayan consumiéndose.
- j) Sala de lavado: en ella se llevarán a cabo las tareas de limpieza de material como jaulas, bebederos, comederos, rejillas metálicas, etc. Es por ello que deberá contar con tomas de agua donde instalar pilas y también sistemas de esterilización por vapor como autoclaves. Se dispondrá también de una lavadora para proceder a la limpieza de la indumentaria del personal al final de cada semana. Esta sala se sitúa en el pasillo sucio y es imprescindible que cualquier material pase por ella antes de entrar en el pasillo limpio.
- k) Sala de máquinas: esta zona albergará todos los productos necesarios para la limpieza y desinfección del centro, así como la maquinaria de los sistemas de refrigeración, filtración, calderas y todo aquello que pueda requerir de un mantenimiento técnico. También será un pequeño taller donde poder realizar las labores de mantenimiento básicas de la instalación, es por eso que una entrada espaciosa y evitar los pasillos estrechos en el interior facilitarán el trabajo de los técnicos.

#### 4.1.3. Áreas de intercomunicación:

Tienen gran importancia para asegurar la circulación de personas, animales y materiales de una forma segura. Una solución bastante eficaz es la utilización del sistema de doble pasillo, sucio y limpio, según conduzcan o procedan del área de limpieza. El inconveniente que tiene este sistema es que requiere de un mayor espacio, cuando pasamos de una zona limpia a una sucia se debe hacer a través de puertas dobles que actúan como esclusa. Tanto los pasillos como las estancias intermedias deberán tener el ancho suficiente como para permitir la circulación de carros y materiales y, en este sentido, la instalación de protecciones laterales en las paredes evitará un mayor deterioro por el roce o choques accidentales de camillas o mesas de disección. Estas áreas de intercomunicación deben disponer de alguna salida de emergencia.

## 4.2. Diseño del edificio

### 4.2.1. Plano:



#### 4.2.2. Dimensiones:

En este apartado se va a definir el tamaño de las instalaciones para que cubran las necesidades del centro:

##### **Zona Gris: 624 m<sup>2</sup>**

- Entrada principal (incluyendo pasillos de acceso): 310 m<sup>2</sup>
- Despacho I: 22 m<sup>2</sup>
- Despacho II: 35 m<sup>2</sup>
- Aula I: 53 m<sup>2</sup>
- Aula II: 52 m<sup>2</sup>
- Sala de reuniones: 45 m<sup>2</sup>
- Sala de descanso: 35 m<sup>2</sup>
- Aseos/Vestuarios masculinos: 27 m<sup>2</sup>
- Aseos/Vestuarios femeninos: 26 m<sup>2</sup>
- Sala equipamiento especial: 19 m<sup>2</sup>

##### **Zona verde: 322 m<sup>2</sup>**

- Salas de experimentación: 146 m<sup>2</sup>
- Laboratorios: 44 m<sup>2</sup>
- Almacén de material estéril: 43 m<sup>2</sup>
- Quirófanos: 89 m<sup>2</sup>

##### **Zona roja: 1204 m<sup>2</sup>**

- Pasillo limpio: 103 m<sup>2</sup>
- Pasillo sucio: 260 m<sup>2</sup>
- Alojamiento cerdos/ovino y caprino/ perros: 172 m<sup>2</sup>
- Alojamiento conejos/cobayas/primates no humanos: 62 m<sup>2</sup>
- Alojamiento ratas: 62 m<sup>2</sup>
- Alojamiento ratas/ratones/hámsters: 62 m<sup>2</sup>
- Alojamiento ratones: 62 m<sup>2</sup>
- Preparación de animales en proceso y postoperatorio: 53 m<sup>2</sup>
- Zona de cuarentena: 72 m<sup>2</sup>
- Zona lavado: 40 m<sup>2</sup>
- Zona autoclave: 39 m<sup>2</sup>
- Sala de máquinas: 73 m<sup>2</sup>
- Almacén de entrada: 63 m<sup>2</sup>
- Sala de necropsias: 63 m<sup>2</sup>
- Contenedor de cadáveres: 18 m<sup>2</sup>

##### **TOTAL: 2150 m<sup>2</sup>**

#### 4.2.3. Capacidad máxima de animales en los alojamientos:

Hay que puntualizar que en ningún caso se van a alojar animales de distintas especies en el mismo alojamiento. En el plano, los alojamientos donde está escrito el nombre de distintos animales es debido a que la sala estará habilitada para alojar esas distintas especies, pero nunca simultáneamente.

La capacidad máxima de animales por alojamiento es la siguiente:

- Alojamiento de cerdos/ovino y caprino/perros:  
172 m<sup>2</sup> de los cuales 22 se emplearán en pasillos y zonas de tránsito y 150 se dividirán en 3 cercados de 50 m<sup>2</sup>. Por tanto, en este alojamiento todos los animales estarán en cercado.
  - Cerdos: con una superficie de 5 m<sup>2</sup> por animal, habrá 10 cerdos por cercado y una capacidad máxima de 30 cerdos en total.
  - Ovino y caprino: con una superficie de 2 m<sup>2</sup> por animal, habrá 25 animales por cercado y un total de 75 como máximo.
  - Perros: tendrán una superficie de 2 m<sup>2</sup> por animal, por lo que habrá 25 perros por cercado y 75 en total.
- Alojamientos ratas/ratones/hámsters:  
Todos ellos van a ser alojados en jaulas. Se va a emplear el mismo modelo de jaula para todos. El modelo de jaula es el Tipo 1000 de Panlab<sup>®</sup>, con unas medidas de 215 x 465 x 145 (mm). Se depositarán en racks modelo Universal Rack THF 3057 de Ehret<sup>®</sup>, con unas medidas de 1280 x 600 x 1790 (mm), que tienen una capacidad de 25 jaulas por rack. El alojamiento de 62 m<sup>2</sup> se va a dividir en 15 m<sup>2</sup> para pasillos y espacios entre racks y 47 m<sup>2</sup> para racks. Se va a destinar un espacio aproximado de 1,5 m<sup>2</sup> por rack por lo que caben 30 racks.
  - Rata: se alojará un animal por jaula, tendremos 25 ratas por rack y una capacidad total de 750 ratas.
  - Ratón/hámster: alojaremos dos animales por jaula con lo que tendremos una capacidad total de 1500 ratones o hámsters.
- Alojamientos de conejos/cobayas:  
El espacio disponible será 47 m<sup>2</sup> para los racks y 15 m<sup>2</sup> para pasillos. Se emplearán los racks modelo RB272718UPG de Allentown<sup>®</sup> con unas medidas de 1702 x 838 x 1778 (mm). Estos racks tienen seis jaulas de plástico extraíbles incorporadas, estas jaulas están diseñadas para poder alojar ambas especies. Si se emplean 2 m<sup>2</sup> por rack caben 23 racks.
  - Conejo: se alojan individualmente, por lo que tenemos 23 racks con 6 jaulas cada uno hacen una capacidad total de 138 conejos.

- Cobaya: también se alojan individualmente por lo que igualmente la capacidad máxima será de 138 cobayas.
- Alojamientos de primates no humanos:

El espacio disponible será de 47 m<sup>2</sup> para racks y 15 m<sup>2</sup> para pasillos. Se emplearán los racks modelo PR32283214 de Allentown<sup>®</sup>, con unas medidas de 2000 x 1000 x 2019 (mm). Cada rack tiene cuatro jaulas de acero inoxidable incorporadas. Teniendo en cuenta que se destinará a cada rack para primates 3 m<sup>2</sup>, caben un total de 15 racks. En cada rack se alojarán individualmente 4 primates por lo que la capacidad máxima de alojamiento es de 60 primates no humanos.

#### 4.2.4. Distribución de las instalaciones:

El plano del punto 4.2.1. muestra cómo deben distribuirse las instalaciones para asegurar el máximo control microbiológico. Este tipo de distribución empezó a emplearse en los estabularios debido a un suceso conocido como el “**incidente Marburg**”. En 1967 se produjo una epidemia de fiebre hemorrágica en un centro de investigación en la ciudad alemana de Marburgo. El patógeno provenía de unos simios verdes ugandeses (*Cercopithecus aethiops*). Los animales comenzaron a enfermar y, debido a que el centro no contaba con las barreras microbiológicas suficientes y el personal desconocía los protocolos para actuar en este tipo de situaciones, enfermaron 37 personas, 25 por entrar en contacto directo con los animales y el resto por ser familiares de los infectados.

En esta distribución, existen dos zonas claramente diferenciadas, una que engloba las zonas grises y verdes (áreas de trabajo), y la otra que engloba las zonas rojas (áreas de estabulación y limpieza). Ambas se separan por una franja azul, la interfase. Esta interfase es una barrera estructural que impide el tránsito de personas desde el área de servicios al área de animales sin haber pasado por el vestuario y por la sala de equipamiento especial. También impide el paso de animales al área de servicios a no ser que sea a través de la sala de preparación de los animales y siempre bajo el control del personal. Es a nivel de esta interfase donde se instalan las barreras como esclusas de doble puerta y los vados sanitarios.

Las estancias tienen distintos colores en función del riesgo biológico de las mismas, de las tareas que se desempeñan allí y del personal que puede acceder a ellas. De tal forma que:

Las zonas de color gris (despachos, sala de reuniones, sala de descanso, aulas, vestuarios y aseos) están a continuación de la entrada principal. Deben encontrarse lo más alejadas posible de los alojamientos de los animales. En ellas se van a llevar a cabo tareas de gerencia, docencia, organización o, en el caso de los vestuarios, preparación del personal. Los trabajadores pueden acceder a estas zonas con la ropa de calle.

Las zonas de color verde (laboratorios, salas de experimentación, quirófanos y almacenes de materiales estériles) son el lugar de trabajo del personal investigador. En ellas se van a realizar los procesos experimentales así como el procesado de las muestras. Estas zonas de trabajo requieren unas medidas higiénicas muy estrictas por lo que para acceder a ellas es necesario que el personal pase por el vestuario y lleve la vestimenta adecuada que no podrá sacar del centro. Para que los animales accedan a estas zonas también deben pasar por la sala de preparación.

Las zonas de color rojo están todas por debajo de la interfase. Se han separado del resto debido a que representan el mayor riesgo microbiológico del centro. Delimitan las zonas de cuarentena, almacenes de material no esterilizado, la zona de lavado, la zona de autoclaves, el pasillo limpio y el pasillo sucio, los alojamientos de los animales, la sala de preparación de los mismos, la sala de necropsias y el almacén de cadáveres. Para que el personal pueda acceder a este recinto, deben utilizar la indumentaria adecuada y además pasar por la sala de equipamiento especial, donde habrá sistemas de desinfección como duchas o pediluvios.

A su vez, dentro de la zona roja encontramos dos subdivisiones, el pasillo sucio y el pasillo limpio. El pasillo sucio va a albergar el almacén de entrada de material y de animales, la zona de cuarentena, la zona de lavado y la salida de residuos. Esta es la zona de mayor riesgo microbiológico ya que cualquier material o animal que entre en el centro lo hará por esta zona y será tratado como material contaminado. Para que los materiales puedan llegar al pasillo limpio deben pasar obligatoriamente por la zona de lavado y esterilización. En el caso de los animales, deben pasar obligatoriamente por la cuarentena. El pasillo limpio da acceso a los alojamientos de los animales y para acceder a este pasillo tanto el personal, el material como los animales deben pasar por descontaminación.

#### 4.2.5. Tránsito dentro del centro:

##### 1. De personal:

Las personas acceden al centro por la puerta principal, en el caso de que vayan a permanecer trabajando en la zona gris, no es necesario que se cambien de ropa pero tendrán terminantemente prohibido el acceso a estancias de otros colores.

En el caso de que vayan a trabajar en las estancias verdes, deben ir a los vestuarios y vestirse con la indumentaria apropiada, ya sea de quirófano o de laboratorio. Si necesitan acceder a las salas grises deben volver a pasar por el vestuario para vestirse con su ropa habitual.

Para el personal que trabaje en el área roja, es imprescindible que se cambien en el vestuario, para posteriormente pasar a la sala de equipamiento especial donde podrán utilizar las duchas y harán uso del pediluvio. La indumentaria para entrar en la zona roja es exclusiva de ésta. En

el caso de que accedan al pasillo sucio y deban entrar de nuevo en el pasillo limpio deberán hacerlo a través de la zona de lavado donde habrá otro pediluvio y una pila donde poder desinfectarse las manos.

## 2. De animales:

Los animales acceden al centro por la zona de recepción de mercancías que se encuentra en el pasillo sucio. Posteriormente deben pasar obligatoriamente por la zona de cuarentena y cuando superen la misma ya podrán ser estabulados en los alojamientos. Para utilizar estos animales en procedimientos experimentales se deben trasladar desde los alojamientos a la zona de preparación, donde serán desinfectados. Después, ya podrán ser trasladados a las estancias marcadas en color verde donde se realizarán los procedimientos. Tras su utilización, los animales volverán a la zona de preparación quirúrgica donde pasarán el postoperatorio. En el caso de que vayan a ser eliminados se procederá a la eutanasia en esta sala y los cadáveres se sacarán del centro por el pasillo sucio. Si, por el contrario, se van a mantener con vida, cuando haya terminado el período de postoperatorio que marque el protocolo, volverán a los alojamientos.

En el caso de que se detecte algún animal enfermo en los alojamientos, se sacará por el pasillo sucio y se trasladará hasta la zona de cuarentena o se procederá según juzgue el personal veterinario.

Si se encuentra algún animal muerto en los alojamientos se deberá comunicar al personal veterinario y se apuntará en el libro de registro de animales. Se sacará por el pasillo sucio hasta el almacén de cadáveres.

## 3. De materiales:

Los materiales que entren al centro lo harán por el almacén de materiales del pasillo sucio. Para introducirlos en el pasillo limpio deberán atravesar la zona de lavado y de esterilización, en caso de ser pienso únicamente pasarán por la esterilización. Una vez descontaminados ya se podrán transportar a la zona de alojamientos o directamente a las áreas verdes donde vayan a ser utilizados en el caso de que se trate de material quirúrgico, por ejemplo. Una vez se acaben de utilizar se transportarán al pasillo sucio y de ser reutilizables se lavarán y se volverán a esterilizar para que puedan atravesar el pasillo limpio de nuevo, o si son desechables se eliminarán. En el caso de materiales como jaulas o bebederos, cuando estén sucios se sacarán de los alojamientos por el pasillo sucio, se llevarán a la zona de lavado y tras el proceso de lavado y esterilización se reintroducirán en los alojamientos. Los residuos generados por los animales se sacarán por el pasillo sucio y se eliminarán.

Con respecto a materiales que vayan a ser utilizados en las áreas grises, como material de oficina, ordenadores, etc, podrán entrar y salir del centro por la entrada principal ya que únicamente van a ser utilizados en el área gris.

#### 4.2.6. Particularidades del sistema de ventilación:

A parte del personal del centro y de los propios animales, el aire es un potencial vector de microorganismos. Además, en un estabulario el sistema de ventilación debe impedir que se difundan los olores de los alojamientos al resto de salas. La principal medida para controlar los olores es la separación de la zona de trabajo (áreas gris y verde) de la zona de alojamientos y lavado (área roja). Esto se consigue por medio de la instalación de dos sistemas de ventilación independientes, uno para las áreas gris y verde y otro para el área roja.

Para diseñar el sistema de ventilación del área roja, es necesario tener en cuenta como se va a distribuir la presión del aire. En el pasillo limpio debe haber una presión positiva, debido a que en este pasillo se encontrarán los inyectores del aire limpio. Los alojamientos de los animales deben tener una presión negativa con respecto al pasillo limpio lo que permitirá la circulación del aire desde el pasillo a los alojamientos. En lo que concierne al pasillo sucio, el aire debe tener una presión negativa con respecto a los alojamientos y al pasillo limpio, de tal forma que se impida la recirculación del aire desde el pasillo sucio al limpio. En el caso de que se quisiera aislar el aire de una sala, la ventilación debería tener una presión negativa con respecto al pasillo limpio, al sucio y al resto de salas, de esta forma se asegura que nada sale de la sala por vía aerógena.

El sistema de ventilación del área verde debe asegurar que en las salas de experimentación con animales y en los laboratorios de procesamiento de muestras la presión del aire sea negativa, de tal forma que no pueda salir de estas salas ningún tipo de olor o sustancia vehiculada en el aire. En el caso de los quirófanos, como se quiere mantener el máximo de esterilidad posible, se debe instalar un sistema de flujo laminar, de entrada del aire por el techo y salida por el suelo, que asegure una presión del aire positiva dentro del quirófano con respecto al exterior. De este modo se consigue evitar que entre en el ambiente estéril cualquier sustancia por el aire procedente del exterior del quirófano.

Con respecto al área gris, el sistema de ventilación no necesita cumplir ningún requisito especial, pero debe permitir una correcta aireación de las salas y es necesario que sea compatible con los requerimientos de las otras áreas descritos anteriormente.

El sistema de aire acondicionado va a encargarse de proporcionar un suministro constante de aire fresco en las condiciones necesarias para asegurar la temperatura, humedad, presión y caudal de aire que se requiere en cada una de las estancias. Para ello, el equipo compuesto por climatizadores se encargará de la circulación y acondicionamiento del aire, ese aire pasará por tratamientos de filtración, acondicionamiento térmico (frío o calor), acondicionamiento de la humedad (deshumidificación o humectación) y distribución del aire mediante conductos que se deben dimensionar atendiendo al caudal necesario. En lo referido a la conducción, un laboratorio corriente se organizaría con una conducción general para el aire de entrada en las estancias y otro general



para el aire de salida. Cuando se albergan diferentes especies con distintas necesidades, se requieren dos conducciones generales de entrada y salida y un conducto de aire entrante y saliente en cada uno de los alojamientos con necesidades especiales que acaben desembocando en la conducción general que comunique con el exterior. Si existe una sala donde el aire puede ser un potencial contaminante o portador de patógenos habrá que poner un filtro absoluto en el conducto de retorno antes del colector general.

Dependiendo del presupuesto del que se disponga, se debe plantear la opción de disponer de una segunda unidad climatizadora independiente de la que funcione regularmente para asegurar el suministro de aire en caso de avería o período de mantenimiento. Siguiendo con las recomendaciones ideales, también sería ventajoso que las dependencias permitan la revisión y mantenimiento de los conductos del aire sin tener que acceder al interior de los mismos.

A continuación se detallan individualmente cada una de las partes del sistema de tratamiento del aire que se requieren:

- Tomas y salidas de aire exterior: deben evitar la recirculación del aire interior y prevenir la entrada de animales desde el exterior.
- Recuperadores energéticos: son sistemas que se instalan en las salidas de aire exterior y recuperan parte de la energía calorífica del aire evacuado.
- Filtros: tanto en los conductos que recojan aire del exterior como en los de salida, en el caso de encontrarnos en una zona donde se vaya a experimentar con patógenos volátiles se deben instalar filtros terminales de alta eficiencia (HEPA) para garantizar la ausencia de gérmenes en el aire que salga de esa zona.
- Ventiladores: son los encargados de que circule el aire por el sistema, su situación natural es junto a los climatizadores. Se pueden utilizar ventiladores más potentes para la conducción general de entrada y salida, o por contra, utilizarlos más pequeños pero individuales para cada estancia, lo que supondría un coste extra y encarecería el mantenimiento. Son una pieza esencial, ya que su avería provoca la ineficacia en todo el sistema de climatización, es por eso que es más interesante instalar ventiladores grandes para la conducción general, pero disponer de ventiladores de reserva para asegurar la ventilación si se produce una avería o alguna tarea de mantenimiento.
- Climatizadores: modifican la temperatura del aire captado del exterior. Los sistemas que se emplean para variar la temperatura son radiadores metálicos independientes según sean de frío o calor. Estos radiadores son controlados de manera electrónica por válvulas y sondas de temperatura que abren o cierran el paso del agua (caliente o fría) dependiendo de la

temperatura.

- Humidificadores: el sistema más común es la humectación por vapor, ya que es el sistema que mejor evita el crecimiento bacteriano. Consiste en recipientes, con una capacidad en función del caudal de aire a tratar, que contienen agua y una resistencia que la va calentando hasta la ebullición, inyectándose el vapor generado directamente en los conductos de ventilación. Es muy importante que los sistemas de inyección del vapor eviten la condensación, ya que eso podría inutilizar los filtros de los conductos de ventilación.
- Conductos: generalmente son de chapa galvanizada con recubrimiento de lana de vidrio o sintética como aislante. Los materiales se eligen en función de la velocidad del aire y del caudal, aunque siempre deben ser lo más estancos posibles. De contar con un habitáculo con filtros HEPA los conductos deberían poder cambiarse sin alterar la integridad de la barrera con respecto a las otras conducciones. Habría que establecer un protocolo para la sustitución de esos conductos.

#### 4.2.7. Conceptos básicos para los materiales de construcción:

Hay que tener en cuenta que la construcción de un animalario requiere que se estudie bien la elección de los materiales. Existen algunos en concreto, que pese a ser de uso común en las obras tradicionales, deben evitarse en este tipo de instalaciones.

Dentro de la construcción de un centro de investigación con animales existen tres pilares básicos que se deben diseñar perfectamente para que el edificio cubra las expectativas, estos son: el sistema de tratamiento del aire ya comentado, el acabado de los paramentos y el tipo de puertas y accesos junto a los desagües y sumideros.

Los paramentos son las separaciones entre las distintas dependencias. Deben garantizar un buen aislamiento térmico y sonoro ya que vamos a alojar animales con distintas necesidades ambientales. Los tabiques pueden ser contruidos de la forma tradicional pero los recubrimientos de las paredes deben tener como características el ser impermeables, resistentes a agentes químicos, al rayado y al fuego, de baja porosidad, elásticos para evitar que se formen grietas y que eviten el crecimiento fúngico. Para cubrir todos estos objetivos se suelen emplear pinturas epoxídicas en paredes y techos y resinas epoxi en los suelos o bien recubrimientos tipo vinilo.

En zonas de elevada humedad como la sala de lavado o la zona de autoclaves será conveniente que el suelo sea antideslizante, además de lo anteriormente comentado.

Facilita mucho la limpieza que las uniones entre paredes y techos sean de tipo media caña,

es decir, que no sea en ángulo recto sino en curva sanitaria. Todos los elementos accesorios como enchufes, lámparas, tuberías, etc, deben ser diseñados de tal forma que enrasen con techos y paredes para evitar crear recobecos donde se aloje el polvo o donde puedan criar insectos, para de esta forma también facilitar la limpieza.

Las puertas son otro de los elementos fundamentales, dependiendo de su localización podrán tener muelles, visores y retenedores, o ser más grandes y pesadas o más ligeras, con más o menos distancia hasta el suelo, cierre eléctrico o tradicional, etc. Para diseñar su tamaño debemos tener en cuenta el tamaño máximo de las estanterías o *racks* que deben pasar a través de ellas, así como el tránsito de gente. Los accesorios que tienen dependen de su utilidad, de tal forma que las puertas de dependencias para animales deberán tener un visor clausurable para permitir inspeccionar su interior sin necesidad de acceder a la dependencia, siendo muy recomendable que tengan un sistema de cierre automático con muelle: estos sistemas de cierre deberán incluirse también en los accesos a áreas de diferente nivel de riesgo biológico y en las esclusas de doble puerta. Las puertas de habitaciones que contengan animales no deben tener una separación con el suelo que permita el paso de ningún animal. Para las puertas de los pasillos, que seguramente soporten mucho tránsito de material rodante, será necesario que estén reforzadas o que tengan protectores para evitar su rápido deterioro. También deberá contarse con puertas específicas en las salidas de emergencia que cuenten con manillas antipánico.

La presencia de desagües o sumideros en las dependencias dependerá del tipo de animal alojado. En general, debemos evitarlas en las áreas donde buscamos una mayor bioseguridad ya que son fuente de contaminaciones. Donde sean necesarios dispondrán de sifón en el caso de fregaderos y lavamanos y de sistemas antiroedores en los sumideros a nivel de suelo. Los desagües forman parte de sistemas de estabulación de algunas especies como cerdos, perros o conejos por lo que en estos casos requerirán de una desinfección periódica. El diseño debe evitar la entrada en sentido inverso de insectos o roedores. A la hora de situar los aseos para el personal debemos aplicar la misma filosofía, y como fuente de contaminación los situaremos lo más alejado posible de los alojamientos y fuera de la zona del pasillo limpio.

#### 4.2.8. Equipamiento básico:

A este respecto, dos elementos son fundamentales, la red de agua y el software de control de las variables ambientales.

El estabulario deberá contar con suministro de agua potable de la red general, por tanto habrá que diseñar todo el sistema de tuberías que asegure el aporte de este recurso fundamental.

Con respecto al sistema de control de variables ambientales, se deben definir las

necesidades de mantenimiento y de qué forma se llevarán a cabo las revisiones por parte del equipo de mantenimiento.

Es necesario que dentro de la zona de investigación y de alojamientos cada sala tenga los siguientes elementos:

- Un termohigrómetro digital, que nos aportará información en tiempo real de la temperatura y la HR.
- Un anemómetro, que determina el caudal del aire, y también da información sobre el grado de renovación del aire y el funcionamiento del sistema de filtros.
- Un detector de gases, que debe medir los niveles de sustancias potencialmente nocivas como el NH<sub>3</sub> o el CO<sub>2</sub>.
- Por otro lado, el equipo de mantenimiento dispondrá de un luxómetro, que permite medir la intensidad lumínica, y de un sonómetro, para medir los decibelios, ambos instrumentos portátiles.

Todos estos elementos se controlan por medio de software específico. Estos programas informáticos permiten acceder a la información que aportan las sondas en tiempo real y podemos programar toda la instalación para que se mantenga dentro de unos parámetros preestablecidos en cada alojamiento, de forma que en el momento en que el parámetro a medir se salga de rango el equipo informático enviará una notificación al ordenador de gestión, pudiendo conocer qué parámetro está alterado, dónde y a qué hora se ha salido de rango, lo que facilita sobremanera las tareas de mantenimiento.

El personal de mantenimiento debe estar pendiente del ordenador de gestión y, en caso de que se reciba alguna notificación, corregir las alteraciones que se produzcan. Debido a que en ocasiones los programas informáticos también fallan, dos veces al día el personal de mantenimiento deberá realizar una vuelta por toda la instalación comprobando los termómetros de cada sala y que esta información concuerda con la recibida en el ordenador central. En el caso de que se produzcan fallos en el programa informático de gestión el equipo de mantenimiento deberá ponerse en contacto lo antes posible con el proveedor del mismo.

Con respecto a las notificaciones de alertas, cuando un parámetro se sale de rango, deberán ser archivadas en formato de un 'parte de incidencias' en el cual se especifique qué parámetro se alteró, la hora, dónde y la fecha. De esta forma, al final de cada mes podrá llevarse a cabo un balance del funcionamiento global de la instalación.

## **5. MEDIDAS DE CONTROL MICROBIOLÓGICO:**

### **5.1. Sistemas de barrera**

Una barrera es una estructura física que permite separar al animal del ambiente externo, produciendo un ambiente especial y controlado que protege a los animales de contaminaciones no deseadas. Vemos por tanto, que las barreras disminuyen la variabilidad experimental, por lo que son necesarias para homogeneizar y obtener unos resultados más fiables en investigación.

A este efecto, debemos tener en cuenta la clasificación de las barreras en el campo de los animales de laboratorio en función del tipo de calidad que se quiere mantener, publicada por el *Institute of Laboratory Animal Research (ILAR)*:

- Tipo I: Barrera de máxima seguridad mediante aisladores destinada al uso de animales gnotobióticos, es decir, que han nacido por cesárea estéril y no han tenido contacto con ningún agente microbiológico.
- Tipo II: Barrera de alta seguridad utilizada en animalarios destinados a producir animales SPF (Specific Pathogen Free).
- Tipo III: Barrera de inferior seguridad a la anterior. Permite trabajar con animales SPF.
- Tipo IV: Barrera de mínima seguridad. No existen medios para asegurar el mantenimiento del estatus microbiológico, es el tipo de barrera utilizada cuando se emplean animales convencionales.

Cualquier tipo de barrera debe pasar una vigilancia para corroborar la integridad de la misma. Tras examinar la clasificación, el estabulario propuesto contará con barreras Tipo IV que se definen a continuación.

#### **5.1.1. Filtración mecánica del aire:**

El sistema se compone de filtros de partículas que se intercalan en el flujo de aire de los conductos de climatización, ya explicados con anterioridad, y cuya misión es retener partículas. Tienen distinto tamaño de poro y su composición varía en función del nivel de bioseguridad que se quiera mantener. Los que se suelen emplear se hacen con fibra de vidrio, aunque también se fabrican con malla metálica o fibras sintéticas. Otros sistemas de filtración del aire más complejos son la filtración química del aire o la ozonización.

### 5.1.2. Sistema de presiones diferenciales:

La distribución de este sistema ha sido expuesta anteriormente en el punto “4.2.6. Particularidades del sistema de ventilación”. Consiste en un sistema que a base de regular los caudales de aire que entran en cada sala se crean gradientes de presión que favorecen que el aire tienda a circular desde las zonas de mayor protección. El control de las presiones se realiza mediante manómetros situados en las distintas salas, conectados al sistema informático de gestión de la climatización. La presión requerida en cada zona se consigue mediante compuertas reguladoras de caudal en la impulsión y extracción, manteniendo estas dentro de unos márgenes preestablecidos.

Se recomienda que exista una diferencia de 50 Pa entre las zonas de mayor protección y el exterior. Para lograr un mantenimiento idóneo de estos gradientes se deben intercalar esclusas de doble puerta con enclavamiento (no pueden abrirse las dos puertas simultáneamente) entre las distintas zonas, evitando así que el aire exterior entre en contacto directo con la zona protegida. Estas puertas dobles se van a instalar en los accesos para atravesar la interfase. Habrá una de estas esclusas en la sala de equipamiento especial por donde se accede al pasillo limpio del área roja, y otra en la sala de preparación de los animales por donde se accederá a la zona de quirófanos del área verde.

### 5.1.3. Filtración y tratamiento del agua:

El agua de bebida de los animales es un importante vehículo para patógenos como *Pseudomonas*, *Coliformes* o *Clostridium*, por tanto su tratamiento es esencial para evitar problemas.

El agua procedente de la red de suministro urbana, que es la que se va a utilizar previsiblemente, viene tratada de las depuradoras municipales que la potabilizan dentro de unos márgenes preestablecidos mediante la adición de desinfectantes, aunque su composición y nivel de desinfección no es constante. Es por ello que debemos asegurarnos de su calidad.

Destacan como principales medidas de barrera la filtración mecánica del agua y el tratamiento con cloro. La filtración mecánica consiste en emplear un filtro por etapas en cartuchos de distinto tamaño de poro en el punto de entrada del agua a nuestro circuito. Aunque esta filtración reduce la carga bacteriana del agua, a parte de quitar las partículas macroscópicas, el filtro deberá ser desinfectado de forma periódica debido a que es común que sea en el propio filtro donde se producen crecimientos de colonias bacterianas.

El otro tratamiento es la cloración. El cloro tiene gran potencia y persistencia como germicida de amplio espectro, además presenta propiedades residuales duraderas por lo que prolonga la desinfección en los sistemas de distribución de agua. Los estándares de agua potable de la

Organización Mundial de la Salud mantienen que debe añadirse entre 2 y 3 mg/L para conseguir una desinfección satisfactoria. Es importante saber que el contenido máximo de cloro es de 5 mg/L. El cloro se añadirá al agua en la concentración recomendada justo después de que ésta pase el filtro mecánico.

#### 5.1.4. Plaguicidas e insecticidas:

A parte de las medidas arquitectónicas ya comentadas para evitar fugas y entradas de animales del exterior, existen varias medidas que se deben tomar. En el caso de los insectos se pueden instalar lámparas atrapa-insectos, que emiten una luz ultravioleta denominada luz negra que atrae a los insectos, razón por la cual se coloca cerca de un campo eléctrico de alta tensión que electrocuta al insecto cuando sus alas rozan el circuito. Este método es muy eficaz para todo tipo de insectos voladores. Pero a parte de esto, es necesario realizar programas periódicos de desinsectación y prevención de roedores salvajes. Se aplican tratamientos químicos y rodenticidas en el perímetro de las zonas que queremos preservar, especialmente en almacenes de pienso y zonas de experimentación, pero asegurando siempre que no se pueda producir la contaminación química del alimento o del aire.

#### 5.1.5. Autoclaves y equipos de esterilización:

Estos elementos van a ser los únicos en garantizar la ausencia de gérmenes en el material tratado. Deberán ser esterilizados todos aquellos materiales que vayan a entrar en la zona limpia. Estas máquinas necesitan una toma al suministro de agua ya que llevan en su interior un sistema de generación de vapor. Para su uso en animalarios, son preferibles los autoclaves que tienen posibilidad de cargar el material a nivel del suelo en carros, por la comodidad que ofrecen, ya que luego en esos mismos carros se puede distribuir ese material por las instalaciones. Se construyen en acero inoxidable, su instalación requiere de gran preparación ya que suelen ser muy pesados, además necesitan un desagüe. Se situarán en la zona de lavado del pasillo sucio.

#### 5.1.6. Recogida de desechos:

Los animales muertos, sus tejidos y excrementos, la cama, los alimentos inutilizados, etc., deberían ser recogidos en recipientes estancos de metal o de plástico con tapas bien ajustadas y bolsas estancas desechables. Las bolsas son esenciales para tejidos animales, cadáveres y residuos radioactivos o tóxicos. Los desechos infecciosos idealmente deberían ser incinerados *in situ*. Si los desechos deben salir de las instalaciones, deberían ser esterilizados por autoclave antes de la recogida. La irradiación gamma es un método relativamente reciente de desinfección de productos de

desechos que está siendo utilizada cada vez más.

Los desechos que no pueden ser rápidamente sacados deben almacenarse en un área fija diseñada para este fin, el contenedor de cadáveres. Tales áreas deben ser libres de plagas, lavarse y desinfectarse fácilmente y estar físicamente separadas de las otras instalaciones de almacenaje. El área de almacenamiento de desechos se debe ubicar de manera que no haya necesidad de llevarlos a través de otros locales de las instalaciones hasta ser eliminados.

Los animales muertos se sacarán de sus jaulas tan pronto como se detecte su muerte. El personal veterinario del centro debe ser informado inmediatamente cuando un animal está enfermo o muerto. Cuando se descubran animales muertos se identificarán adecuadamente, se pondrán en bolsas desechables de plástico y se trasladarán a la sala de necropsias. En la sala de necropsias, se les realizará la pertinente necropsia o serán depositados en las cámaras frigoríficas del contenedor de cadáveres anexo a la sala de necropsias.

#### 5.1.7. Prácticas a llevar a cabo por el personal:

Todos los sistemas de barrera comentados anteriormente son muy importantes, aunque pueden resultar inútiles si el personal que trabaja en el centro no realiza unas rutinas y técnicas de trabajo que promuevan la preservación de la bioseguridad. Es necesario que cualquier centro de esta índole siga el código de Buenas Prácticas de Laboratorio. Además, todos deberán cumplir unas sencillas normas de higiene y pasar controles sanitarios.

Destacan dos puntos que pueden resultar especialmente importantes:

- **Entrada y salida del personal:**  
Los trabajadores del centro son el mayor vehículo potencial de contaminación cuando acceden a las zonas de alojamientos e investigación, tanto para la entrada como para la salida de contaminantes. Es por ello, que el acceso a estas zonas debe producirse previo paso por los vestuarios y por la sala de equipamiento especial. Los vestuarios cuentan con taquillas, donde tanto los alumnos como el personal podrán dejar la ropa de calle y cambiarse como se especifica más tarde. Quedará terminantemente prohibido el acceso a zonas de trabajo o de alojamientos sin la vestimenta apropiada, ya sea de uso regular o desechable.
- **Vestimenta específica:**  
Tanto los alumnos en prácticas como los trabajadores del centro deberán ir debidamente vestidos. Para acceder a las zonas de investigación y los alojamientos de pequeños animales se deberá ir equipado, como mínimo, con un pijama, una bata de ser necesaria, y unos zuecos. En el caso de las zonas de alojamiento y trabajo con grandes animales se deberá ir



equipado con un mono y con botas de goma. Los alumnos de prácticas deberán traer su indumentaria de casa y se exigirá la pulcritud necesaria. Los trabajadores tendrán su ropa de trabajo en la taquilla, quedando terminantemente prohibida la salida de la ropa del centro. Al final de la semana, cada trabajador llevará su uniforme a la sala de lavado, en el almacén recibirán la vestimenta para la semana siguiente. Cada empleado tendrá un mínimo de dos uniformes para ir alternando.

En el caso de los quirófanos, será obligatorio el uso de guantes, mascarilla y cubrepelo, todo ello estéril y desechable. El pijama no puede ser el mismo que se emplee en la zona de alojamientos.

Se ha comprobado que las manos son la principal fuente de contaminantes, es por ello que el uso de guantes tanto para manipulación de los animales como para su cuidado es fundamental. Tanto los trabajadores como los alumnos deberán acostumbrarse a las rutinas donde es necesario cambiar de guantes entre los distintos procedimientos de trabajo y también cuando se muevan por las distintas zonas de alojamiento o vayan a tratar con distintas especies. Otra posible opción, antes que cambiar de guantes tan frecuentemente, es pulverizarlos o enjuagarlos con sustancias desinfectantes.

#### 5.1.8. Control de visitas a las instalaciones:

Un estabulario no está destinado a recibir visitas con asiduidad. Las visitas suponen un gran riesgo potencial de contaminación y además pueden interferir en los resultados de los estudios.

En el caso de tener que producirse, deben ser avisadas con antelación y, si son autorizadas, los visitantes deberán seguir los protocolos de vestuario establecidos para alumnos y trabajadores. Las visitas deberán dejar constancia en el libro de visitas, donde deberá aparecer la fecha de la visita y motivo de la misma, el nombre y número de D.N.I. En el caso de que la visita se trate de un técnico de mantenimiento de alguno de los equipos y deba acceder a la zona de animales o experimentación debemos asegurarnos de que no venga de ningún otro estabulario o centro de cría de animales: de ser así, debería pasar por un período de cuarentena.

El centro debe contar con ropa desechable para garantizar que las visitas puedan acceder a las instalaciones correctamente equipadas.

## 5.2. Medidas de control sanitario en los animales

La primera medida de control es la observación. Los cuidadores deben conocer los indicadores de sufrimiento o malestar (que se exponen en el apartado **“7.1.Indicadores de enfermedad, dolor o sufrimiento”** para cada una de las especies). Es necesario que dos veces al

día el personal realice una vuelta por los alojamientos para comprobar que el estado de los animales es el adecuado. En caso de detectar algún animal con comportamiento extraño o enfermizo se deberá comunicar al personal veterinario. Si las sospechas de enfermedad continúan, el animal deberá ser trasladado a la zona de cuarentena donde será examinado.

Con respecto a la detección rutinaria de patógenos en los animales, la opción barajada ha sido la de contactar con un laboratorio externo para que realice todas las determinaciones. Se ha consultado el catálogo de Harlan<sup>tm</sup> como laboratorio externo, y estas son las determinaciones que recomiendan:

ESPECIE	AGENTE	FRECUENCIA
Ratón	<b>Virus</b>	Cada 3 meses
	Ectromelia virus Lymphocytic choriomeningitis virus Minute virus of mice Mouse adenovirus type 1 (MAd FL) Mouse adenovirus type 2 (MAd K87) Mouse cytomegalovirus Mouse hepatitis virus Mouse Norovirus Mouse parvovirus Mouse rotavirus (EDIM) Pneumonia virus of mice Reovirus type 3 (Reo 3) Sendai virus Theiler's murine encephalomyelitis virus	
	<b>Bacterias, Micoplasmas y Hongos</b>	
	<i>Citrobacter rodentium</i> <i>Clostridium piliforme</i> <i>Corynebacterium kutscheri</i> <i>Helicobacter spp</i> <i>Mycoplasma spp</i> <i>Pasteurella spp</i> <i>Salmonella sp</i> <i>Streptobacillus moniliformis</i> <i>Streptococci Beta-haemolytic</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i>	
	<b>Parásitos</b>	

	<p>Ectoparásitos Endoparásitos <i>Syphacia obvelata</i></p>	
	<b>Lesiones patológicas</b>	
	<p>Externas Hallazgos de necropsia</p>	
<b>Rata</b>	<b>Virus</b>	Cada 3 meses
	<p>Hantavirus Kilham rat virus Mouse adenovirus type 1 (MAd FL) Mouse adenovirus type 2 (MAd K87) Pneumonia virus of mice Rat parvovirus Reovirus type 3 Sendai virus Sialodacryoadenitis virus</p>	
	<b>Bacterias, Micoplasmas y Hongos</b>	
	<p><i>Bordetella bronchiseptica</i> <i>Clostridium piliforme</i> <i>Corynebacterium kutscheri</i> <i>Helicobacter spp</i> <i>Mycoplasma spp</i> <i>Pasteurella spp</i> <i>Salmonella sp</i> <i>Streptobacillus moniliformis</i> <i>Streptococci Beta-haemolytic</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i></p>	
	<b>Parásitos</b>	
	<p>Ectoparásitos Endoparásitos <i>Trichomonas sp</i></p>	
	<b>Lesiones Patológicas</b>	
	<p>Externas Hallazgos de necropsia</p>	
<b>Hámster</b>	<b>Virus</b>	Cada 3 meses
	Lymphocytic choriomeningitis virus	

	Pneumonia virus of mice Reovirus type 3 Sendai virus Simian virus 5	
	<b>Bacterias, Micoplasmas y Hongos</b>	
	<i>Bordetella bronchiseptica</i> <i>Clostridium piliforme</i> <i>Corynebacterium kutscheri</i> <i>Helicobacter spp</i> <i>Klebsiella pneumonia</i> <i>Mycoplasma spp</i> <i>Pasteurella spp</i> <i>Salmonella spp</i> <i>Streptococcus pneumonia</i> <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	
	<b>Parásitos</b>	
	Ectooparásitos Endoparásitos <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	
	<b>Lesiones patológicas</b>	
	Externas Hallazgos de necropsia	
<b>Cobaya</b>	<b>Virus</b>	Cada 3 meses
	Guinea Pig Adenovirus Guinea Pig Cytomegalovirus Lymphocytic choriomeningitis virus Parainfluenza virus 3 Sendai virus	
	<b>Bacterias, Micoplasmas y Hongos</b>	
	<i>Bordetella bronchiseptica</i> <i>Chlamydia psittaci</i> <i>Clostridium piliforme</i> <i>Corynebacterium kutscheri</i> <i>Dermatophytes</i> <i>Pasteurella spp</i> <i>Salmonella spp</i> <i>Streptobacillus moniliformis</i>	

	<p><i>Streptococci Beta-haemolytic</i>  <i>Streptococcus pneumoniae</i>  <i>Yersinia pseudotuberculosis</i></p> <p><b>Parásitos</b></p> <p>Endoparásitos</p> <p>Ectoparásitos</p> <p><i>Encephalitozoon cuniculi</i></p> <p><b>Lesiones patológicas</b></p> <p>Externas</p> <p>Hallazgos de necropsia</p>	
<b>Conejo</b>	<p><b>Virus</b></p> <p>Rabbit haemorrhagic disease virus  Rabbit pox virus (Myxomatosis)  Rabbit rotavirus</p> <p><b>Bacterias, Micoplasmas y Hongos</b></p> <p><i>Bordetella bronchiseptica</i>  <i>Clostridium piliforme</i>  <i>Dermatophytes</i>  <i>Pasteurella spp</i>  <i>Salmonella spp</i>  <i>Treponema cuniculi</i></p> <p><b>Parásitos</b></p> <p>Endoparásitos</p> <p>Ectoparásitos</p> <p><i>Encephalitozoon cuniculi</i></p> <p><b>Lesiones patológicas</b></p> <p>Externas</p> <p>Hallazgos de necropsia</p>	Cada 3 meses

Estos son los análisis básicos para asegurar que los animales de experimentación están en unas condiciones sanitarias óptimas. Además, Harland<sup>tm</sup> ofrece más analíticas para animales axénicos o que hayan sido criados en condiciones SPF. En caso de querer trabajar con este laboratorio, la forma de proceder sería la siguiente: cada tres meses se deben enviar dos animales vivos de cada una de las especies a analizar. Hay que tener en cuenta que la sede de este laboratorio se encuentra en Reino Unido por lo que las condiciones de transporte de los animales deben ser

óptimas.

Para el resto de especies, no existe un catálogo base de pruebas, pero igualmente se puede solicitar un presupuesto indicando la especie animal en cuestión y los patógenos que se quieren detectar.

## **6. ALIMENTACIÓN DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN:**

El estado nutricional de los animales de experimentación va a estar directamente relacionado con la calidad de la alimentación. Un correcto estado nutricional permite que el animal alcance todo su potencial genético en aspectos claves como el crecimiento, la reproducción y la longevidad. Además, una correcta alimentación permite a los animales responder mejor a desafíos ambientales como el contacto con agentes patógenos.

### **6.1. Tipos de dietas**

En este apartado, se ha contactado directamente con Panlab<sup>®</sup>, un proveedor de dietas de animales de experimentación. Se realizó una consulta de su catálogo, del cual se podrían seleccionar los siguientes productos:

- a) Alimento para cría de rata y ratón: A03/R03, SAFE (*Scientific Animal Food & Engineering*):  
Este pienso está diseñado para alimentar reproductoras en gestación o lactación y, por tanto, también crías antes del destete. Se administra a las crías desde el nacimiento y a las madres en el momento en que estén gestantes o en lactación. El consumo diario ronda los 15 a 22 g en ratas y 6 a 10 g en ratones. Se presenta en forma de gránulos de 10 mm de diámetro. Este producto no requiere ninguna medida especial para su conservación más allá de las habituales que se exponen más adelante.
- b) Alimento para mantenimiento de rata, ratón y hámster: A04/A04C/R04, SAFE (*Scientific Animal Food & Engineering*):  
Está destinado a alimentar animales adultos dentro del marco de la investigación. Se distribuye desde el destete hasta el sacrificio. El consumo diario es de 15 a 25 g en ratas y 5 a 10 g en ratones. La forma de presentación es un granulado de 15 mm de diámetro.
- c) Alimento para cobaya: 114/114C/R14, SAFE (*Scientific Animal Food & Engineering*):  
Está diseñado para cubrir las necesidades de cobayas, tanto jóvenes como adultos. Se distribuye desde el nacimiento y el consumo de los adultos es de 35 a 50 g al día. El pienso se presenta en granulado de 3 mm de diámetro.
- d) Alimento para conejo: 112/112C, SAFE (*Scientific Animal Food & Engineering*):  
Este pienso está destinado al cuidado y mantenimiento de conejos. Se da a animales adultos, a partir de las 16 semanas. La distribución es a voluntad del investigador. El consumo diario es de 100 a 150 g dependiendo de la raza y el peso. El producto se presenta granulado con un diámetro de 4,5 mm.

- e) Alimento para perro: 125/125C3, SAFE (*Scientific Animal Food & Engineering*):  
Este pienso se ha diseñado para mantener a perros adultos no reproductores. Se da a partir de los 6 meses de edad. El consumo diario está en torno a los 25 a 30 g/Kg de peso. El pienso se presenta con un granulado de 10 mm de diámetro.
- f) Alimento para primates no humanos: 107/107C, SAFE (*Scientific Animal Food & Engineering*):  
Ha sido diseñado para el mantenimiento de primates sin actividad. Se puede suministrar a los animales adultos desde el período de aclimatación al entorno experimental. El consumo va a ser muy variable en función de la especie, el peso y la edad. El producto se presenta granulado con un diámetro de 10 mm.
- g) Alimento para grandes animales (ovino, caprino y porcino):  
No se ha encontrado ningún proveedor que ofrezca un pienso comercial específico para estos animales cuando se trata del marco de investigación. No obstante, Panlab<sup>®</sup> ofrece la posibilidad de personalizar los piensos en todos los aspectos (modo de presentación, composición, balance energético, etc.) por lo que su equipo técnico puede ayudar en el asesoramiento a la hora de elaborar un pienso que cubra las necesidades nutricionales de nuestros animales.

## 6.2. Regímenes alimenticios

Dependiendo del animal de laboratorio y de los requerimientos experimentales para los que van a ser utilizados existen distintos regímenes donde escoger, donde varían la cantidad total ingerida o los tiempos de ingesta.

**Alimentación *ad libitum*:** supone el libre acceso al alimento durante todo el día. Cuando se aplica este régimen a conejos y roedores consumirán aproximadamente el 80% de la ración en la fase de oscuridad. Este tipo de alimentación suele emplearse en experimentos de corta duración, principalmente porque reduce el tiempo que se debe dedicar al mantenimiento de los animales. También suele emplearse en animales en reproducción y en crecimiento. En experimentos de larga duración este tipo de régimen ha llegado a ser considerado como la variable incontrolada más significativa que puede afectar al resultado final de experimentos en roedores.

En *ad libitum* se suministra comida para varios días (se aconseja no más de 48 horas sin reponer el alimento).

**Alimentación restringida:** supone una limitación moderada de la dieta con objeto de evitar la sobrealimentación, aunque asegurando que no se produzcan deficiencias de ningún nutriente. El grupo de San Antonio del *National Institute on Aging* (NIA) ha desarrollado dos métodos de



alimentación restringida para un amplio grupo de especies, incluyendo primates. Se procede de la siguiente manera:

- Alimentación restringida moderada: el animal recibe en torno al 70% de la ingesta voluntaria diaria.
- Alimentación restringida estricta: el animal recibe solo un 50-60% de la ingestión voluntaria diaria.

La alimentación restringida implica una mayor asistencia técnica, material y espacio necesario. Se debe suministrar la comida a diario (preferiblemente en el mismo período horario) y se debe tener en cuenta que este régimen puede generar competencia y agresividad en animales alojados en grupo, lo que podría desembocar en una desnutrición de los individuos menos fuertes.

**Alimentación horaria o controlada:** los animales tienen disponible tanta comida como quieran pero solo durante períodos de tiempo fijados al día. Este régimen es muy útil en experimentos donde se van a medir parámetros fisiológicos o bioquímicos en respuesta a la ingesta y se comparan con los niveles de los mismos en ayunas.

### 6.3. Conservación y control de calidad de las dietas

Tanto la conservación como el control constituyen dos aspectos fundamentales para garantizar que las dietas no van a ejercer un efecto distorsionador de los resultados experimentales.

Las fuentes de contaminación pueden ser de origen abiótico (residuos de pesticidas, metales pesados, etc.), bióticos (microorganismos, hormonas, etc.) o antibióticos. La presencia de cualquiera de estos elementos en la alimentación de los animales puede alterar su homeostasis. Pueden influir en los procesos fisiológicos, metabólicos y en el estado de salud de los animales utilizados, y consecuentemente, en los resultados experimentales.

#### 6.3.1. Almacenamiento de las dietas:

El control empezará cuando el producto adquirido llegue al centro. Antes de su aceptación definitiva el personal deberá:

- Asegurarse de que las condiciones en la que llegan los alimentos son óptimas (envasado y etiquetado correcto, ausencia de humedad o sacos rotos, fecha de fabricación y caducidad).
- Comprobar que las fórmulas que figura en el etiquetado concuerda con el pedido.

- Previa a la entrada del pienso en el pasillo limpio, el personal debe asegurarse de que se procede a la esterilización del mismo.

Se aconseja no aceptar partidas fabricadas con más de tres meses de antelación a su consumo. Solo se justifica la compra de grandes cantidades de pienso para experimentos de larga duración con la finalidad de adquirir un único lote de fabricación y asegurarse así de que no varían las concentraciones de nutrientes.

Los piensos deben almacenarse siempre en lugares frescos y secos. Con respecto a la humedad, es preferible un nivel homogéneo antes que la existencia de zonas con alto contenido en humedad. Tanto el calor como la humedad promueven la incubación de huevos y la aparición de insectos. Cualquier tipo de actividad metabólica en el pienso va a generar agua, que incrementa la humedad, acelerando el proceso de deterioro y la pérdida de las propiedades nutritivas del alimento. Es esencial evitar la entrada de roedores y pájaros en el almacén de pienso. Es por ello que deberá disponer de mosquiteras, barreras antiroedores y estaciones de cebos en las proximidades, como barrera preventiva y detectora de la presencia de roedores foráneos.

#### 6.3.2. Contaminantes abióticos, bióticos, y método de esterilización:

Con respecto a los contaminantes abióticos, algunos especialmente importantes en la nutrición de los animales de experimentación son: las micotoxinas, nitrosaminas, pesticidas, metales pesados, saponinas y fitoestrógenos.

Las casas de pienso envían controles periódicos de este tipo de contaminantes con el rango de niveles aceptados por las reglamentaciones internacionales. Tanto para los animales de laboratorio convencionales de alta calidad como para los SPF no se debe permitir presencia de estas sustancias. En un estabulario como el propuesto, se aceptará el pienso siempre que los residuos entren dentro de los parámetros permitidos por la legislación.

Las dietas de animales de laboratorio, por su propia composición o porque se ha producido una contaminación, constituyen de forma directa un medio de transmisión y cultivo de gérmenes, conocidos como contaminantes bióticos. Estos germenos pueden originar alteraciones metabólicas y/o digestivas, e indirectamente repercutir sobre los resultados de los ensayos. La forma que tienen los proveedores de asegurar que su producto cumple con el estándar microbiológico recomendado es someter a las harinas a un pre-acondicionamiento con vapor a alta temperatura antes de formar el pellet.

No obstante, se debe conocer qué concentraciones de microorganismos baraja el estándar microbiológico recomendado:

- Bacterias aerobias mesófilas:  $<1 \times 10^6/g$
- Coliformes  $<1 \times 10^2/g$
- Enterococos  $<1 \times 10^2/g$
- Salmonella ausencia en 25g
- Clostridium perfringens  $<1 \times 10^1/g$
- Estafilococos patógenos  $<1 \times 10^1/g$
- Hongos y levaduras  $<1 \times 10^2/g$

En caso de sospechar alguna posible contaminación, lo que debemos hacer es ponernos en contacto con el proveedor, comentarles el problema y de confirmarse, desechar ese pienso.

El proceso de esterilización del pienso se debe llevar a cabo en un autoclave a una temperatura superior a 120 °C y a más de 1 atmósfera de presión. La destrucción de los contaminantes se produce cuando es liberado el calor latente por condensación, después del vacío, garantizando el mantenimiento de la temperatura precisa durante el tiempo necesario, ya que es esencial la penetración completa del vapor en los pellets. Para conseguir estas condiciones se tendrán que extender los pellets en capas inferiores a 3 cm de espesor, para asegurar una distribución homogénea del calor.

## **7. BIENESTAR ANIMAL:**

Dejando de un lado los aspectos éticos y morales, en este apartado se van a describir unos criterios para reconocer el estado de los animales de experimentación. En este área no se debe caer en el error de la analogía entre lo que sienten los animales y lo que siente el ser humano. Hay que ser conscientes de que los animales cuentan con un sistema nervioso similar al del hombre que les permite sentir dolor como mecanismo de adaptación. Este apartado se centrará en lo que se refiere al estado de los animales y al cuidado del animal en sí mismo.

A este respecto, el mayor empuje en el desarrollo del Bienestar Animal se ha llevado a cabo gracias al trabajo de la UFAW (*University Federation for Animal Welfare*) de Inglaterra y el AWIC (*Animal Welfare Information Center*) de los EEUU.

### **7.1. Indicadores de enfermedad, dolor o sufrimiento**

Antes de numerar los indicadores, es necesario exponer algunos conceptos que ayudan a entender porque se han elegido esos indicadores. Además, como no se dispone de un listado de indicadores de sufrimiento de todas las especies, el hecho de saber como se seleccionan facilitará la tarea de extrapolar esos signos de una especie a otra.

No se puede entender el concepto de bienestar sin tener en cuenta el de homeostasis. La homeostasis es el estado en el que el animal está en armonía consigo mismo y con su entorno, tanto en su conducta como fisiológicamente. Engloba tanto los aspectos del medio interno (temperatura corporal, glucosa en sangre, contenido de agua en el cuerpo, etc.) como los del ambiente (posición en la escala social, temperatura ambiente, HR, etc.). Supone, por tanto, la capacidad de un animal para mantener sus parámetros a unos niveles normales. Un animal sólo es capaz de mantener esos niveles cuando dispone de los medios fisiológicos y conductuales para normalizar la situación. Sin embargo, cuando un animal es incapaz de mantener su homeostasis, con el paso del tiempo desarrollará estrés, que se puede manifestar como una conducta anormal o una enfermedad.

Ahora sale a colación el concepto de estrés, que es una alteración de la homeostasis del animal en condiciones extremas, un efecto que actúa sobre el individuo desbordando su sistema de control y reduciendo la eficacia de su organismo. Los desafíos ambientales se producen constantemente, pero para que deriven en estrés tienen que fallar los mecanismos de control.

Esto se da cuando el animal no tiene:

- Predecibilidad: capacidad de predecir el desafío ambiental procedente de su entorno inmediato.
- Controlabilidad: capacidad de control del individuo ante una situación desafiante.

Teniendo en cuenta estos factores se pueden distinguir dos tipos de estrés:

- a) El estrés agudo: es el estado que se produce en un organismo después de una disminución repentina de la predecibilidad y/o la controlabilidad de los cambios ambientales.
- b) El estrés crónico: es el estado de un organismo cuando los aspectos ambientales relevantes tienen una baja predecibilidad y/o no son controlables durante un largo período de tiempo.

Para un organismo es más fácil reponerse de una situación de estrés agudo que crónico, aunque si las situaciones de estrés agudo acaban por producirse con mucha frecuencia derivarán en un proceso crónico.

Todos estos conceptos son los que se utilizan para evaluar el Bienestar Animal. Basándose en estos criterios se han determinado unos signos claves que son indicadores de dolor o sufrimiento en los animales de experimentación más frecuentemente utilizados:

<b>ANIMAL</b>	<b>RATÓN</b>
SIGNOS FISIOLÓGICOS	
OCULARES	Respuesta pupilar excesiva, los párpados pueden aparecer cerrados o semicerrados. Si la condición empeora, ojos hundidos y descarga ocular.
RESPIRATORIO	Ritmo aumentado, se puede producir descarga nasal.
ASPECTO	Piloerección, pérdida de apariencia y peso, deshidratación, lordosis. El abdomen hundido indica el intestino vacío, se manchan con sus excrementos.
HECES Y ORINA	Ambas se ven afectadas, pudiendo producirse ausencia o falta de consistencia en las heces.
VIBRISAS	Aumentan los movimientos de las vibrisas llegando a ser menos evidentes si el dolor o la tensión continúan.
COMPORTAMIENTO	Se mostrarán cada vez más tímidos y aprensivos, con tendencias agresivas y de morder. Cuando la condición empeora el animal se muestra inactivo, sin respuesta y se separa del grupo. En situaciones muy graves, inconsciente a estímulos.
ACTIVIDAD ANORMAL	Reflejo de alejamiento, pugna, mordeduras, puede intentar morder la fuente de dolor o el área afectada, aumenta su actividad. Deja de comer y beber normalmente, incapaz de dormir o asearse y aumentan las heridas o rasguños. Veremos movimientos de retorcimiento cuando el dolor es

	abdominal.
POSTURA	Posición gradual de encorvado, dormitando.
LOCOMOCIÓN	El dolor en las extremidades afecta a la locomoción. Los movimientos súbitos y rápidos impiden las posturas principales. Desplazamiento inseguro, dificultad para andar en línea recta, veremos movimientos circulares cuando el equilibrio está afectado. Movimientos en rodillo con el desarrollo de ascitis.
VOCALIZACIÓN	Agresiva al inicio del dolor, decrece cuando se reduce el estrés.
GENERAL	Hipotermia y deterioro del estado físico.
<b>SIGNOS CLAVES</b>	Reflejo de alejamiento/huída, piloerección, encorvamiento, mordiscos, ojos y abdomen hundidos, pérdida de peso, deshidratación.

<b>ANIMAL</b>	<b>RATA</b>
SIGNOS FISIOLÓGICOS	
OCULARES	Párpados semicerrados. Los ojos pueden aparecer hundidos, la descarga ocular es común, progresando de un rojo manchado a un tono marronáceo, conocido como el "ojo con gafas".
RESPIRATORIO	Un aumento de la actividad respiratoria está asociada con estornudos y descarga nasal a veces sanguinolenta.
ASPECTO	Aumento de la piloerección. El pelo muestra un aspecto desaliñado con alguna pérdida en zonas aisladas. Reducción del tono muscular, evidencia de pérdida de actividad muscular. Se produce deshidratación y pérdida de peso.
HECES Y ORINA	Puede aumentar el estreñimiento o la diarrea dependiendo de los sistemas afectados. La orina disminuye con la incapacidad de beber pero la frecuencia puede aumentar en infecciones renales o perturbaciones hormonales.
CONDUCTA	Los animales inicialmente muestran un comportamiento agresivo y con tendencia a morder, si se agrava la situación se van volviendo cada vez más pasivos.
ACTIVIDAD ANORMAL	Incremento de la somnolencia. Cesa de comer y beber con normalidad. Se reduce la conducta exploratoria. Muestra conducta aversiva hacia otros animales. Casos de automutilación de zonas afectadas.
POSTURA	Contracción abdominal si el dolor se concentra en el abdomen.

	Gradualmente asume una postura encorvada con la cabeza en el abdomen.
LOCOMOCIÓN	Cojera de una o más extremidades, o simplemente, marcha cuidadosa. Los movimientos tensos se asocian con dolor abdominal. El desplazamiento lento se asocia con obstrucción intestinal o ascitis. En situaciones de estrés pueden darse movimientos circulares.
VOCALIZACIÓN	Inicialmente aumenta la vocalización agresiva, especialmente en la manipulación, después se observa un descenso gradual de la respuesta vocal aunque el dolor continúe, a no ser que se provoque un estímulo doloroso súbito más intenso.
GENERAL	Hipotermia, aspecto pálido de las mucosas puede indicar pérdida de sangre, anemia o deshidratación.
<b>SIGNOS CLAVES</b>	Vocalización y lucha excesiva, lamerse/protegerse, pérdida de peso, piloerección, lordosis.

<b>ANIMAL</b>	<b>HÁMSTER SIRIO</b>
SIGNOS FISIOLÓGICOS	
OCULAR	Descarga ocular asociada normalmente con la tensión. La tendencia a dormir durante largos períodos del día puede complicar la observación.
RESPIRATORIO	La modificación de la frecuencia se asocia con problemas de pulmón.
ASPECTO	La pérdida de pelaje puede estar relacionada con déficit de vitamina E y ácidos grasos en la dieta. Se observa descamación de la piel.
HECES Y ORINA	El estreñimiento es raro. La diarrea cuando ocurre es profusa y líquida, manchándose la región perineal. Infección urinaria a veces unida a una obstrucción parcial de la uretra y ocasionalmente de cistitis especialmente en los machos.
CONDUCTA	Respuesta demasiado agresiva al intentar manipularlo.
ACTIVIDAD ANORMAL	Sueño diurno, los períodos pueden extenderse durante el día, aumentando la laxitud salvo cuando es manejado. Las pautas de comportamiento exploratorio se reducen y existe comportamiento aversivo frente a los compañeros de jaula.
POSTURA	Aspecto encorvado. La negación a mover las articulaciones puede estar relacionado con un dolor abdominal intenso. El desplazamiento recostado lateralmente puede indicar que el animal está moribundo.

LOCOMOCIÓN	Se ve afectada cuando está asociada con el dolor. Los movimientos rígidos o tensos a veces asociados con una patología abdominal.
VOCALIZACIÓN	En situaciones de dolor o peligro emiten un chillido intenso. Sin embargo, es también la respuesta común cuando es manipulado de forma rutinaria.
GENERAL	Hipotermia, pérdida de peso, rabo mojado al orinarse, diarrea, úlceras en el hocico y las zarpas.
<b>SIGNOS CLAVES</b>	Pérdida de peso, aumento de la agresión o la depresión, extensos períodos de sueño.

<b>ANIMAL</b>	<b>CONEJO</b>
SIGNOS FISIOLÓGICOS	
OCULAR	Descarga lacrimal, con inflamación de la membrana nictitante, como respuesta común a condiciones de estrés. Aspecto somnoliento bajo condiciones continuas de estrés o dolor. El animal parece fotofóbico.
RESPIRACIÓN	Aumento del ritmo respiratorio asociado con inmovilización o compresión del pulmón. Descarga nasal mucopurulenta en caso de infección de vías respiratorias superiores.
ASPECTO	No suelen mostrar mucha pérdida evidente de su condición cuando están enfermos. Un examen cuidadoso podrá detectar la pérdida de reflejo muscular en el dorso inferior. La deshidratación es común. Se ensucia con sus propias heces.
HECES Y ORINA	El estreñimiento y la diarrea son comunes. El fracaso para orinar puede presagiar infecciones urinarias debido a la acumulación de depósitos urinarios.
COMPORTAMIENTO	Aumento de depresión, progresiva inactividad y carencia de respuesta. Tendencia a situarse lo más lejos posible de la luz. El comportamiento exploratorio cesa.
ACTIVIDAD ANORMAL	Cesa la ingestión de agua y alimento. Un aseo excesivo puede propiciar la formación de tricomas en el estómago.
POSTURA	El estar tumbado con el cuerpo y patas extendidas hacia delante o atrás para reducir presión, indica malestar abdominal. También se dan casos de tortícolis.
LOCOMOCIÓN	Puede existir dolor asociado con la locomoción, especialmente pies doloridos. La parálisis temporal puede aparecer localmente en puntos de tensión debidos al rasurado.



<b>VOCALIZACIÓN</b>	Muy poca tendencia a la vocalización bajo condiciones normales. El dolor súbito puede provocar vocalización durante períodos cortos.
<b>SIGNOS CLAVES</b>	Inactividad, no come o bebe. El dorso apoyado en la pared de la jaula. Vocalización, chillidos agudos, cuando es manipulado.

<b>ANIMAL</b>	<b>PERRO</b>
<b>SIGNOS FISIOLÓGICOS</b>	
<b>OCULAR</b>	Ojos claros y expresivos son un buen indicador de la salud general. Cuando se detecta ojos opacos o hundidos es síntoma de malestar.
<b>RESPIRACIÓN</b>	Frecuencia aumentada o respiración forzada. Descarga nasal mucosa.
<b>ASPECTO</b>	Los perros enfermos o con problemas crónicos tendrán frecuentemente un pelo áspero y descuidado. El animal puede dejar de asearse.
<b>HECES Y ORINA</b>	Se debe dar una atención especial en presencia de diarrea, heces con moco, sangre o helmintos.
<b>COMPORTAMIENTO</b>	Los perros que ladran mucho, que se quedan en el fondo de la jaula, que rehúsan acudir a la llamada del cuidador o que demuestran tendencias agresivas cuando alguien se aproxima.
<b>ACTIVIDAD ANORMAL</b>	Se debe prestar atención a casos de inapetencia o de ingestión demasiado rápida de alimentos; igualmente, se deben investigar los cambios súbitos de peso o de las maneras de comer o beber.
<b>POSTURA</b>	Los perros enfermos o deprimidos pueden aparecer letárgicos o encogidos en el fondo de la jaula o de la perrera. La observación del paso y del aspecto de los miembros puede sugerir una infección o un trauma localizado.
<b>LOCOMOCIÓN</b>	Los movimientos rígidos o muy dubitativos pueden asociarse a problemas esqueléticos.
<b>VOCALIZACIÓN</b>	Muy frecuente indica ansiedad o malestar.
<b>SIGNOS CLAVES</b>	Inapetencia, mordedura de las áreas dolorosas, anormalmente aprensivo.

Resto de especies:

<b>ANIMAL</b>	<b>SIGNOS CLAVES</b>
<b>PRIMATE NO HUMANO</b>	Posición encorvada, ausencia de limpieza, rechazo de alimentos o agua, aspecto desanimado.

<b>COBAYA</b>	Alejamiento, vocalización, ausencia de resistencia a la inmovilización, pelaje hirsuto, ausencia de respuesta.
<b>OVEJA Y CABRA</b>	Postura rígida o tumbada, ausencia de movimiento, separación del grupo, depresión.
<b>CERDO</b>	Vocalización muy frecuente, desaparición de comportamiento social con el resto del grupo, paso dificultoso, postura antiálgida, excesiva agresividad.

## 7.2. Medidas correctoras

Estas medidas se definen en el momento que se identifica el problema, si no son infructíferas. La previsión del sufrimiento que un procedimiento experimental va a causar en los animales, es decir, su severidad, se puede conocer por medio de los Protocolos de Supervisión.

La función esencial de estos protocolos es la de detectar cuando se está afectando al bienestar de los animales. Cualquier investigador debería diseñar una ficha de supervisión individualizada para cada grupo de animales del estudio antes de iniciar el procedimiento. Los elementos más importantes para incluir en esta ficha son:

- a) **Peso del animal:** Tal como se ha comentado en las tablas anteriores, uno de los primeros signos de dolor o de cualquier otro estímulo estresante es la pérdida de peso. Esto se debe a que esos estímulos negativos inhiben el consumo de alimento. El peso será un parámetro especialmente útil en procedimientos largos. En general, pérdidas de peso iguales o superiores a un 20-25% se consideran indicativas de un problema severo.
- b) **Aspecto del animal:** Tanto la piloerección como un pelo desordenado y sin brillo son indicativos de un problema. Debemos tener en cuenta que las situaciones de estrés crónico inhiben la conducta normal de acicalamiento de los animales. En segundo lugar, es importante comprobar la presencia de secreciones oculares o nasales, así como la presencia de restos de diarrea en la región perianal. Finalmente, las posturas anormales antiálgidas y los temblores son indicadores importantes de problemas de bienestar.
- c) **Comportamiento:** La inactividad y falta de relación con los congéneres puede indicar un problema, aunque muchas de las especies de experimentación son de hábitos principalmente nocturnos. Las conductas de automutilación, las convulsiones, la disnea y las vocalizaciones anormales indican generalmente un problema grave.
- d) **Respuesta del animal a la manipulación:** Este parámetro únicamente será útil cuando la persona que manipula los animales esté acostumbrada a la respuesta normal de los

animales. Tanto una respuesta excesivamente pasiva como agresiva son indicadores de problemas.

- e) Variables clínicas: Los cambios en la temperatura corporal y en la frecuencia cardíaca y respiratoria pueden indicar un problema de estrés o dolor.

Teniendo en cuenta estos sencillos parámetros, debería llevarse a cabo una revisión rutinaria diaria de todos ellos, con excepción del peso que puede hacerse semanalmente.

Las medidas correctoras propiamente dichas no son un aspecto complicado, por ejemplo, si se detecta que el problema se encuentra en la temperatura ambiente habrá que corregirla, si hay agresividad dentro de los grupos habrá que redistribuirlos, etc. La cuestión es identificar cual es el factor que causa el estrés o el dolor para ponerle solución de una forma efectiva.

### 7.3. Enriquecimiento ambiental

El enriquecimiento ambiental está definido por **Beaver** (1989) como "los elementos adicionales al ambiente de un animal con los cuales puede interactuar."

Por regla general, la mayoría de los animales de experimentación son animales sociables y que se benefician de la compañía de sus congéneres o del ser humano. También, las interacciones mejoran generalmente el bienestar del animal, mientras que los reagrupamientos frecuentes y la fase de estabilización de esos grupos dan resultados opuestos.

Se debe recordar que las experiencias de un animal durante sus fases de desarrollo determinan su comportamiento social. Por tanto, las condiciones de alojamiento de un animal en una instalación de crianza tendrán un impacto sobre su bienestar futuro.

Se deben dar la misma importancia a las necesidades sociales de los animales usados en la investigación, en la enseñanza o en pruebas, como a los factores ambientales tales como la iluminación, la calefacción, la ventilación y la contención (jaulas). Particularmente en el caso de animales alojados individualmente, la observación diaria provee una forma alternativa de contacto social para el animal, y usualmente facilita las manipulaciones, en el sentido que el animal se acostumbra a la presencia del humano. No obstante, se debe intentar evitar el alojamiento individual de los animales a no ser que sea estrictamente necesario para el experimento que se lleve a cabo.

La existencia de un ambiente más complejo, el uso de dispositivos artificiales, y el mejor aprovechamiento del espacio existente tienen efectos estimulantes para los animales. El simple hecho de aumentar la superficie disponible para un animal no favorece una utilización mejor del

espacio; sin embargo, el espacio se debe adaptar a la especie animal.

En animales alojados en grupos, se debe evaluar regularmente la relación del grupo social y del espacio disponible.

### 7.3.1. Medidas de enriquecimiento ambiental para cada especie:

**Ratón:** es importante que la cama les permita escarbar. Se pueden añadir objetos como telas o paños que los animales van a utilizar en la nidificación. Con respecto a este último instinto, **Van de Weerd et al.** (1998) llevaron a cabo estudios donde se añadían botellas de plástico que los animales acababan utilizando como madriguera. Pese a que para algunos investigadores esta medida era buena, para **Haemisch et al.** aumentaba la frecuencia de las peleas entre los animales por adquirir el mejor sitio dentro de la botella. Por eso mismo no se recomienda la inclusión de materiales de estas características, además dificultan las tareas de limpieza.

Con respecto a las características de la jaula, **Boyd y Love** (1995) realizaron estudio que comparaba el bienestar de ratones estabulados en jaulas rectangulares sencillas frente a otros que permanecían en jaulas con divisores verticales que contenían agujeros que servían de paso de un compartimento a otro. Los ratones alojados en jaulas divididas y más complejas tenían un comportamiento más activo, por lo que se concluyó que este tipo de alojamiento dividido puede asemejarse más a las condiciones de vida natural del ratón.

**Rata: Weihe** (1987) recomienda enriquecer el ambiente de la jaula con la adición de papel, de viruta, de bolitas o granos, que al igual que al ratón, les va a permitir escarbar. Este autor advierte de que el uso de suelo enrejillado con estos animales está totalmente contraindicado. Aconseja utilizar jaulas rectangulares como más efectivas respecto a las cuadradas, con un mínimo de 20 cm de altura, lo que va a permitir comportamientos naturales de estos animales como permanecer sobre las dos extremidades posteriores o dar pequeños saltos.

**Hámster sirio: Hobbs** (1987) afirma que el efecto saludable de correr en una rueda nunca fue demostrado y además es complejo instalar una de estas ruedas en cada jaula de un estabulario; sin embargo, si la altura del techo de la jaula es suficiente se provee al animal de la oportunidad de escalar y hacer ejercicio.

**Cobaya:** se puede añadir al suelo de la jaula pequeñas cajas, fáciles de limpiar y con una apertura. De esta forma ofrecemos a los animales un lugar donde esconderse además de proveer alguna variedad en el ambiente.

**Conejo:** Anon (1989) demostró que las tablas de reposo tienen un efecto relajante en los conejos, también puede añadirse un nidal para que puedan esconderse, aunque no es común si no se busca que críen. Se ha sugerido la adición de tubos como madrigueras aunque obviamente esto complica mucho las tareas de limpieza y organización de las jaulas. Lo que si parece efectivo es introducir dentro de las jaulas objetos como latas o botes metálicos para que los animales jueguen y los manipulen.

**Perro:** la adición de elementos de enriquecimiento, como juguetes u otros dispositivos, es muy frecuente para producir un cambio deseado en su comportamiento. Por ejemplo, un pedazo de cuero u otra cosa para morder puede disminuir un comportamiento anormal o persistente de aseo; sin embargo, esto se debería hacer solamente con la aprobación del investigador y del director de la instalación. **Beaver** (1989) apunta que los perros reaccionan bien cuando se enriquece su ambiente con laberintos en los cuales pueden correr.

La música se ha usado durante algunos años para reducir el estrés en muchas instalaciones donde hay animales de laboratorio. Sin embargo, pocos datos definitivos existen que avalen su uso en los perros. Si se usa, el volumen se debe ajustar a tono de conversación. Los niveles que exceden 85 dB por un período prolongado pueden ocasionar daños auditivos. También se debe recordar que muchos animales de laboratorio, incluyendo los perros, son capaces de oír frecuencias elevadas que no son perceptibles por el ser humano.

Pero como métodos de enriquecimiento ambiental fundamentales en el perro destacan la relación con los cuidadores y el ejercicio. Las interrelaciones entre humanos y perros asegurarán la correcta socialización de estos animales. En este sentido, es mucho más importante la calidad del contacto con el cuidador que la duración del mismo.

Mediante la observación, los cuidadores van a poder establecer si cada perro tiene un comportamiento normal en su grupo social. La participación de varias personas en la socialización de cada perro y en el fortalecimiento de su comportamiento, permite evitar el problema del apego exagerado a un individuo.

Las personas que trabajan en el mantenimiento de las instalaciones deberían incluir en su rutina de trabajo el pasar algo de tiempo con los perros. Este tiempo va a repercutir positivamente en los animales reduciendo la ansiedad. La manera de actuar del personal puede producir un efecto sobre los animales y así influir en los resultados de la experimentación.

Con respecto al ejercicio, fue recientemente reglamentado en la ley estadounidense que exige "que las instalaciones de investigación establezcan, por escrito, en consulta con el veterinario de la institución, procedimientos y sistemas para el ejercicio de los perros..." (USDA, 1989). **Dale Schwindaman**, Vice-ministro adjunto del Regulatory Enforcement, Animal and Plant Health Inspection

Services del U.S. Department of Agriculture, señala que, con relación a los requerimientos de socialización y de ejercicio, puede ser que los contactos sociales con otros perros o con humanos en caso de animales alojados solos, sean más importantes que el ejercicio. Informó que los perros necesitan tener la posibilidad de ver y oír a otros perros, además de ser alojados en grupos compatibles.

Datos científicos demostraron que el tamaño de las jaulas no tenía ningún efecto importante sobre los valores hematológicos o bioquímicos en los beagles de crianza; que los perros tenían poca inclinación por hacer ejercicio cuando se llevaban a áreas destinadas a tal efecto, a menos que haya humanos presentes y que aún un programa moderado de ejercicio no tenía ningún efecto demostrable sobre parámetros bioquímicos tales como hematología, química clínica o indicadores de estrés.

Otros estudios concluyeron que, en promedio, los perros solamente hacen ejercicio de media hora a una hora y media al día haciendo cualquier tipo de actividad, sin considerar el sistema de alojamiento. La mayoría de las actividades de los perros tienen lugar durante las horas de la mañana, durante el tiempo de mayor actividad humana en el área. El incremento de contactos con los humanos mejorará la manipulación y las características de comportamiento de los perros.

En conclusión, se debe recordar que se debería vigilar las reacciones de los animales a los diferentes medios de enriquecimiento ambiental, para averiguar si se lograron los objetivos. Ningún estudio ha determinado la cantidad de actividad que es realmente beneficiosa para una especie animal en concreto. Ni se ha demostrado que los comportamientos estereotípicos sean beneficiosos o nocivos. Todavía se deben adquirir y acumular nuevos conocimientos sobre el comportamiento animal para proveer un ambiente que mejore el bienestar de los perros.

**Primates no humanos:** es importante dar al animal un máximo control sobre su ambiente (o la sensación de que se tiene ese control). Para enriquecer la vida de estos animales y favorecer las actividades, se pueden instalar dispositivos tales como ramas pequeñas, juguetes, varas, hamacas y juguetes que escondan alimentos. La adición de tales elementos de enriquecimiento es particularmente importante para los animales alojados individualmente, donde los dispositivos que favorecen actividades de búsqueda parecen tener más éxito. **Jerome y Szostak** (1987) sostienen que los mandriles utilizan elementos que estimulan la búsqueda de alimentos más frecuentemente que los juguetes. Una posibilidad son los juguetes que contienen zumo congelado, crema de cacahuets o fruta. Se pueden esconder semillas, etc., en una cama espesa. Tales prácticas obligan al mono a buscar y/o trabajar para encontrar sus alimentos. Esta tarea estimulará el instinto de búsqueda que tienen en su ambiente natural, y será útil para reducir las manifestaciones estereotipadas e incrementar el comportamiento exploratorio.

La escalada es un ejercicio especialmente bueno. **Wolff y Ruppert** (1991), en un informe sobre un programa de ejercicio que involucraba a monos rhesus, cinomolgus y capuchinos, denotaron que la mayoría de los animales reaccionaban de una manera positiva al programa de ejercicios. Se podía minimizar las peleas y las heridas mediante la observación continua. Gran parte del comportamiento agresivo dejó de ser físico, se expresaba vocalmente o por el castañeteo de los dientes en vez de morder.

**Bryant, Rupniak e Iversen** (1988) sostienen que los animales se benefician más de un ambiente de vida enriquecido que de un programa de ejercicios.

Las pruebas de elección permiten al animal indicar su preferencia para un ambiente o un juguete. Otras pruebas miden la frecuencia de uso de un nuevo espacio o de nuevos juguetes. Se ha sugerido la rotación de los juguetes como medio de estimulación.

Dada la importancia de la visión en estos animales, se deberían ubicar las jaulas de manera tal que los monos puedan ver a otros animales de su especie. Las jaulas con paredes laterales llenas impiden el contacto visual. Si el contacto físico es posible, se debe asegurar que los animales sean compatibles.

No hay concordancia de opiniones con respecto al uso de dispositivos audiovisuales (radio, video, televisión) para mejorar el bienestar de los primates no humanos. Estos parecen ser particularmente beneficiosos cuando los monos tienen la libertad de encender y apagar los aparatos. En algunas situaciones, el uso de métodos auditivos servirá para calmarlos, pero algunos sonidos pueden molestarlos y causar estrés. Los medios visuales de enriquecimiento pueden ser estresantes si los monos perciben las imágenes como amenazantes. Esto puede ser evitado por la preparación de vídeos especialmente concebidos para ellos. Se ha observado que los monos están particularmente interesados en imágenes que representan su ambiente natural, o los animales que lo pueblan y que también les gustan los vídeos de ellos mismos.

En lo que respecta al trato con los cuidadores, es preferible que las relaciones con el investigador o los técnicos sean tan frecuentes como sea posible. La comunicación verbal con los monos, combinada con la presencia física del humano, es suficiente para que se acostumbren al hombre y puede reducir el estrés.

Es la responsabilidad de cada institución evaluar la cuestión de los contactos físicos directos entre humanos y los primates no humanos. En muchas circunstancias, es preferible autorizar solamente los contactos necesarios, para evitar los lazos excesivamente fuertes entre cuidador y animal, ya que estos se rompen cada vez que el personal cambia o en el momento de la eutanasia, así como por los riesgos de transmisión de zoonosis.

**Grandes animales (oveja, cabra y cerdo):** son animales gregarios por lo que en la medida de lo posible hay que intentar evitar el alojamiento individual. Se deben acortar los períodos de aislamiento y de inmovilización para usarlos solo cuando es absolutamente necesario, y no meramente por conveniencia del investigador. Se debería permitir a los animales alojados individualmente mantener un contacto visual por lo menos con otro animal, a menos que el aislamiento sea requerido por fines de la experimentación y que haya sido aprobado por el Comité de protección de los animales.

Para los cerdos, en particular, mantener un contacto olfativo puede ser tan importante como un contacto visual. Para las ovejas, la región de la cabeza es el punto más importante para reconocerse, y por lo tanto nunca debería ser ocultada desde la perspectiva de ovejas vecinas que tratan de mantener un contacto visual.

En el caso de los cerdos, si se les provee de juguetes como balones o neumáticos sí que los manipulan y juegan con ellos.



## **8. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES:**

### **8.1. Administración de sustancias y vías**

La administración de fármacos u otro tipo de sustancias se realizan por diferentes vías que se clasifican en enterales, parenterales, vía tópica e inhalatoria. Las sustancias suelen administrarse en solución y los principales solventes acuosos son el agua destilada, la solución salina fisiológica al 0,9% o el suero glucosado al 5%.

**-Vía enteral:** es la forma natural de absorción de sustancias en el intestino. Dentro de esta vía tenemos la vía oral (administración por boca) o la vía rectal (administración por el ano). La sustancia puede suministrarse en el alimento o en el agua de bebida o bien mediante la administración forzada utilizando una sonda. La mayoría de las sustancias que se administran tienen un sabor poco agradable y los animales no las ingieren voluntariamente. Se pueden utilizar excipientes de alta palatabilidad para favorecer la ingesta, un ejemplo es la administración de analgésicos en la rata donde se ha añadido la sustancia a una gelatina alimentaria de sabor a frutas. Este método permite controlar perfectamente la dosificación de la sustancia en cuestión.

La alternativa más frecuente a la ingesta voluntaria es la administración forzada a través de un catéter introducido por la boca hasta el esófago o estómago. En roedores se puede utilizar un catéter metálico recto o curvo con el extremo abotonado (redondeado y abultado) para evitar dañar el tracto digestivo a su paso. El diámetro del catéter es de 0,8 mm en ratones y hasta 1-2 mm para ratas o cobayas. El animal debe ser inmovilizado de forma que la cabeza, el cuello y el tórax formen una línea recta. No obstante, siempre se debe considerar la posibilidad de que el catéter sea introducido en la tráquea, aunque en el animal consciente el reflejo de deglución facilita el paso al esófago. Si el catéter está en el sistema respiratorio se confirmará por la presencia de tos, dificultad respiratoria o dificultad para el avance del catéter. Si esto ocurre, la sonda debe retirarse e reintroducirse nuevamente en el esófago.

En animales de mayor tamaño se utilizan sondas flexibles de plástico que presentan un extremo redondeado. Para evitar que el animal muerda el catéter se utilizan mordazas o piezas de plástico o madera con un agujero central por el cual pasar la sonda. En el caso de los monos, toleran mucho mejor la introducción del catéter por vía nasal. El diámetro de los tubos es de 3-5 mm para el conejo, 4-7 mm para el perro y más de 10 mm en cerdos y ovejas.

**-Vía parenteral:** esta vía implica la ruptura de las barreras del organismo, la piel y las mucosas, depositando las sustancias en los tejidos o en cavidades internas del organismo. El método más común es la inyección, depositando las sustancias dentro de la piel (vía intradérmica, ID) o debajo de ella en el tejido subcutáneo (vía subcutánea, SC), en los músculos (vía intramuscular, IM), en las venas (vía intravenosa, IV), o en cavidades como la pleural (vía intrapleural), peritoneal (vía

intraperitoneal, IP). Otras menos frecuentes incluyen las arterias (vía intraarterial), los espacios articulares (vía intraarticular), el espacio epidural, situado en el canal medular óseo de la médula espinal (vía epidural), el espacio subdural (vía intradural), la cisterna magna (vía intracisternal), los ventrículos cerebrales (vía intracerebro ventricular) y la tráquea (vía intratraqueal).

Las más frecuentes son:

La inyección SC es la más sencilla y tolerada de todas, aunque la absorción de sustancias por esta vía es relativamente lenta. Especies como los roedores, el conejo, y en menor medida el perro y los rumiantes presentan un tejido subcutáneo elástico que admite volúmenes de líquido relativamente grandes sin que se produzcan alteraciones. En el caso del cerdo, la piel ya no es tan elástica y la tolerancia es menor. El punto de inyección más común es el dorso y la región interescapular. Para realizar una inyección SC se crea un pliegue de piel con los dedos índice y pulgar levantando la piel, a modo de tienda de campaña, introduciendo la aguja debajo y paralela a la superficie corporal. La inyección de líquido puede notarse con los dedos a través de la piel o simplemente puede observarse un abultamiento de la zona.

La inyección IP es la vía de elección en roedores, ya que normalmente la vía IV resulta más difícil de acceso y la vía IM presenta limitaciones en el volumen de inyección. Presenta como mayor inconveniente el riesgo de lesión de los órganos abdominales. La inyección IP no es común en animales de mediano tamaño o grandes como perros, cerdos o rumiantes. En el caso del conejo también se valoran como primeras opciones la vía SC o IV. La forma de proceder en el caso de la rata, por ejemplo, es la sujeción del animal (técnica explicada en el apartado e) *Manejo, pág. 36*). El punto de inyección se localiza en el cuadrante inferior derecho del abdomen del animal, lateral a la línea media (1 cm aproximadamente), para evitar la inyección de la vejiga urinaria, y al menos 2 cm caudal a la última costilla para evitar inyectar en el hígado. La longitud de la aguja no debe superar 1 cm en el caso de roedores, ya que de ser así se aumenta la posibilidad de inyectar en un órgano o de lesionar las estructuras circundantes.

La inyección IM debe realizarse en regiones anatómicas donde exista una masa muscular amplia como la región glútea o la parte anterolateral del muslo (músculo cuádriceps). El acceso debe hacerse lateral desde el lado externo para evitar pinchar la vena, arteria y nervio femorales que discurren por la cara interna del muslo. Para evitar la inyección accidental en un vaso sanguíneo siempre debe aspirarse antes de inyectar, para comprobar que no fluye sangre a través de la aguja, en cuyo caso se debe inyectar en otro punto distinto. En algunas especies como el cerdo también puede usarse la región del cuello. Siempre debe tenerse en cuenta la limitación del volumen máximo que puede inyectarse y que puede llegar a ser mínimo en roedores pequeños (0,1 ml). De necesitarse la administración de grandes volúmenes emplearíamos otra vía o utilizar diferentes puntos de inyección si es vía IM.

La inyección IV permite depositar una sustancia directamente en la sangre. Se realiza sobre venas superficiales del organismo que varían dependiendo de la especie. En roedores, el calibre de las venas dificulta su acceso, siendo la vía IP una alternativa de elección. En la administración IV el fármaco produce unos efectos mucho más rápidos y potentes al no ser necesaria la absorción de la sustancia desde los tejidos. Es por esto que las dosis suelen ser inferiores a las empleadas en otras vías.

La vía IV requiere el abordaje del vaso con la aguja formando un ángulo de 15-30° sobre la vena. En el caso de venas de gran movilidad en el espacio subcutáneo, como la vena yugular en el perro, la aguja puede incidir lateralmente al vaso y una vez que la punta de la aguja ha atravesado la piel se aborda. Esto no es necesario en las venas de la cola del ratón y la rata. Para inyectar, la jeringa puede sujetarse con los dedos índice y corazón. Hay que mantener la aguja inmóvil para asegurar que el líquido se deposita en el mismo punto. La jeringa no debe contener burbujas de aire ya que pueden producir un émbolo gaseoso. Para esta vía de administración en el caso del ratón y la rata se puede emplear las venas coccígeas. Para el cerdo, conejo y cobaya se suelen emplear los vasos sanguíneos presentes en las orejas, en el perro y el primate no humano se suele escoger la vena cefálica en la extremidad anterior. Para el resto de especies, por norma general, se puede utilizar la yugular.

## **8.2. Toma de muestras**

### **8.2.1. Sangre:**

La sangre puede obtenerse a partir de venas, arterias o directamente del corazón. El volumen máximo de extracción recomendable es el 10% del volumen de sangre total (50-80 ml/Kg). Este volumen máximo podrá volverse a extraer tras 3 o 4 semanas. Si la sangre se recoge sin añadirle ningún anticoagulante ésta se coagulará en poco minutos.

### **Métodos de extracción:**

**Exanguinación:** es un proceso agudo que permite sacar la máxima cantidad de sangre de un animal.

- a) Decapitación: Aconsejada únicamente en animales de pequeño tamaño (roedores). Es un método simple y rápido que permite la extracción de sangre a partir de las arterias que atraviesan el cuello y que son seccionadas con una cuchilla o guillotina.
- b) Del corazón: el acceso percutáneo al corazón resulta sencillo, pero presenta un elevado riesgo para el animal. Por ello debe realizarse siempre bajo anestesia y seguido del sacrificio

del animal. El procedimiento puede llevarse a cabo sobre el lado izquierdo del tórax, sobre la zona de proyección cardíaca fácilmente determinable por palpación. En animales pequeños resulta más cómodo en decúbito supino, es decir, con el dorso apoyado sobre la mesa, y el abordaje se realiza por debajo del esternón. En este caso sí que necesitaremos que la aguja de la jeringa sea larga, de 4-5 cm.

### **Venopunción:**

- a) De las venas de la cola: las venas coccígeas se sitúan a ambos lados de la cola en su punto central. Para este procedimiento el animal puede estar anestesiado o en un cepo de inmovilización, donde la cola queda fuera para su manipulación. Se debe aplicar presión en la base de la cola para que las venas se ingurgiten. Normalmente se sujeta la cola con una mano y se dobla ligeramente. La aguja se inserta en la piel, en la mitad o tercio posterior de la cola, doblada de modo que, una vez introducida la aguja, pueda avanzar en paralelo dentro del vaso.
- b) Vena yugular: discurre lateralmente a cada lado del cuello, bajo la piel. La vena se dilata realizando una ligera presión sobre la base del cuello a un lado. Puede pincharse directamente a través de la piel, pero en algunas especies esta vena es muy móvil, una alternativa es la inmovilización de la misma entre dos dedos en el momento de la punción. La yugular discurre conjuntamente con una arteria y un nervio, existe la posibilidad de dañar ambos. La punción accidental de una arteria requiere la aplicación de presión prolongada (más de 2 minutos) sobre el punto de inyección para evitar la formación de un hematoma o una hemorragia.
- c) Vena cava: en el cerdo es una alternativa más sencilla que la vena yugular. Esta se punciona percutáneamente mediante la introducción de un catéter en la base del cuello y dirigido hacia el tórax. En la rata se realiza mediante una laparotomía o apertura de la cavidad abdominal por la línea media, retirando el paquete intestinal y accediendo a la vena cava caudal a la altura de los riñones.
- d) Vena safena: es una alternativa a la extracción de las venas coccígeas utilizadas en ratas y ratones, especialmente en aquellas especies de roedores carentes de cola (hámster y cobaya). La cantidad que se puede obtener por esta vía es generalmente pequeña, pero es posible utilizar ambas venas safenas por lo que se podrían obtener muestras con regularidad. Para acceder a esta vena son necesarias dos personas, mientras una inmoviliza al animal por el pliegue dorsal, la otra extiende una de las patas posteriores y retira el pelo que cubre la vena safena. Una vez localizada la vena, se punciona.

- e) Plexo venoso orbital: la dificultad de acceso a venas en pequeños roedores ha favorecido la utilización de esta vía. El animal debe ser anestesiado previamente. El procedimiento se realiza mediante la introducción de un capilar en el canto medial (interno) del ojo, avanzando entre el globo y la cavidad ocular hasta romper el frágil seno venoso, llenándose el tubo por capilaridad. La cantidad obtenida es limitada y el procedimiento no es estéril. Las complicaciones más frecuentes se derivan de la lesión de las estructuras anatómicas que pueden provocar ceguera o pérdida del ojo en algunos casos, especialmente si quedan fragmentos de vidrio en la cavidad ocular.

Puntos de venopunción en las diferentes especies:

	Ratón	Hámster	Rata	Cobaya	Conejo	Perro	Cerdo	Oveja y Cabra	Mono
<b>Corazón</b>	-	-	+	M. E.	-	-	-	-	+
<b>Vena yugular</b>	-	+	+	+	+	M. E.	M. E. Cava	M. E.	+
<b>Vena femoral</b>	-	-	-	-	-	+	-	+	+
<b>Vena cefálica</b>	-	-	-	-	-	M. E.	-	+	+
<b>Venas de la oreja</b>	+	-	-	+	M. E.	-	+	-	-
<b>Seno orbital</b>	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>Venas de la cola</b>	Amp.	-	M. E.	-	-	-	+	-	+
<b>Volumen máximo (ml/Kg)</b>	10	10	10	5	5	5	5	5	5

(M. E.: Método de Elección, +: vía aceptable, -: vía contraindicada, Amp.: en el ratón aunque se puede obtener sangre de la vena coccígea, el procedimiento de elección es la ampuntación de la cola.)

#### **Arteriopunción:**

Por la frecuencia con la que se utiliza en el conejo es destacable la extracción de sangre de la arteria central de la oreja. Para proceder se debe sujetar al animal envolviéndolo en una toalla o

utilizando un sistema de contención de conejos donde únicamente queden expuestas las orejas y el animal no pueda moverse. Debido a que este proceso de restricción genera un gran estrés, es una técnica que requiere de experiencia y rapidez. Se debe sujetar la oreja y rasurar la cara dorsal, por lo que la arteria que discurre por el centro de la oreja quedará expuesta. Una vez rasurado el campo se debe aplicar alguna sustancia desinfectante como la povidona yodada sobre la zona donde se va a pinchar. Posteriormente, se extrae la sangre de la parte más distal de la oreja con una jeringa. Dependiendo del tamaño del conejo se pueden extraer entre 0,5 y 5 ml de sangre. La operación podrá repetirse hasta un máximo de ocho veces cada 24 horas. Una vez acabada la extracción y antes de dejar al animal en su jaula se debe cortar la hemorragia aplicando presión suavemente con un algodón durante aproximadamente 2 minutos en el lugar de punción.

#### 8.2.2. Heces y orina:

Estas muestras pueden recogerse fácilmente con la simple manipulación del animal, ya que en muchos casos orinan y defecan como respuesta al estrés del contacto con el ser humano. La obtención de la totalidad de las heces u orina producidas por un animal en un período de tiempo concreto requiere el uso de una jaula metabólica. Este tipo de jaula individual permite la recogida por separado de heces y orina en tubos distintos.

#### 8.2.3. Otros fluidos corporales:

El líquido cefalorraquídeo se obtiene normalmente a partir de la cisterna magna, espacio situado entre el cráneo y la primera vértebra cervical (atlas), en el punto de salida de la médula espinal. También puede obtenerse a través de los espacios intervertebrales correspondientes a las regiones del cuello, tórax y lumbar. Para este procedimiento es necesario sedar o anestesiarse previamente al animal.

La bilis se obtiene introduciendo un catéter en el conducto colédoco que conecta la vesícula biliar con el intestino. Siempre bajo anestesia, y teniendo en cuenta que el catéter obstruirá el conducto por lo que este procedimiento es agudo.

La obtención de linfa se realiza bajo anestesia a partir del conducto torácico situado en la cavidad torácica y paralelo a la aorta.

El líquido ascítico se obtiene mediante inyección de la cavidad abdominal. En animales sanos no existe como para poder ser extraído con una jeringa.

#### 8.2.4. Biopsia:

Es la extracción de una pequeña muestra de tejido sólido. Normalmente, las muestras se obtienen al final del experimento y contemplan la eutanasia del animal. Si el procedimiento de extracción debe realizarse con el animal vivo se llevarán a cabo todas las técnicas quirúrgicas, de analgesia y anestesia que garanticen el mínimo sufrimiento animal.

### **8.3. Procedimientos quirúrgicos básicos en la rata**

A continuación, se exponen de manera breve y resumida, algunos de los procedimientos quirúrgicos básicos que se deben conocer y que se explicarían a lo largo de las prácticas que los alumnos realicen en nuestro centro.

#### 8.3.1. Laparotomía:

Consiste en la apertura de la cavidad abdominal. Aunque puede realizarse desde varios puntos anatómicos, la más común es la que emplea un abordaje medio sobre la línea media o alba. La rata anestesiada es colocada sobre su dorso (decúbito supino), se rasura el abdomen y se aplica una solución antiséptica (generalmente de povidona yodada) y se realiza el corte medio desde un punto situado a 1-2 cm bajo el apéndice xifoides del esternón hasta otro situado a unos 2 cm de la región inguinal, no se debe hacer una incisión demasiado caudal puesto que se expondría la vejiga de la orina. El propósito de la intervención influirá a la hora de realizar una apertura mayor o menor o realizarla más craneal o caudalmente; el acceso al hígado o el estómago estará facilitado por un corte situado cranealmente, dado que estas vísceras se encuentran en esa posición, pero la longitud total de la herida debe ser la mínima que permita un acceso cómodo a la cavidad abdominal. La recuperación del animal será tanto más rápida como menor sea la herida. El sangrado se controla fácilmente aplicando una gasa con una presión suave durante unos segundos.

Una vez realizado el corte en la piel se visualiza inmediatamente debajo la línea alba, que se corta con unas tijeras. Para ello, se levanta la pared muscular con unas pinzas para crear un espacio entre la misma y las vísceras abdominales y se realiza un corte sobre la línea alba con tijera, que se amplía posteriormente en toda la longitud requerida de la herida. El peritoneo se corta al mismo tiempo. El sangrado no debe producirse si el corte se realiza correctamente sobre la línea alba evitando cortar el músculo abdominal que se inserta en la misma. Ya se podrá acceder a la cavidad abdominal.

El cierre de la herida se realiza mediante una sutura interrumpida con puntos sueltos o con una sutura continua del peritoneo y la pared muscular con sutura absorbible de 3/0 ó 4/0. Posteriormente se sutura la piel, preferiblemente con puntos sueltos de sutura absorbible o no

absorbible de 2/0 ó 3/0 cada 5 mm como mínimo o bien con una sutura continua. En el caso de emplear sutura no absorbible como la seda, los puntos deben retirarse a los 7-10 días.

### 8.3.2. Acceso a grandes vasos: cateterización de la vena yugular:

La cateterización de grandes vasos es uno de los procedimientos más comunes en experimentación animal. Antes de realizar el abordaje hay que considerar el tipo de catéter adecuado para canular el vaso y el propósito deseado.

Para la cateterización de la vena yugular se coloca al animal en decúbito dorsal rasurando y desinfectando el cuello. El corte en la piel se realiza paralelo a la zona media del cuello a 3-5 mm y en toda la extensión del cuello. La vena yugular debe localizarse levantando los bordes de la herida bajo la piel y se limpia del tejido adyacente mediante disección roma en el sentido de la herida. Con una pinza dentada se levanta la vena para terminar la disección de la vena por su parte inferior. Una vez disecada la vena se realiza una ligadura en el extremo distal (el más alejado del corazón) y se realiza un nudo en su extremo proximal (el más cercano al corazón) pero sin apretarlo.

Se mantiene una tracción suave del vaso a través de las ligaduras levantando la vena con unas pinzas de microcirugía (pinzas de iris o similares). Se realiza un corte entre las mismas con una tijera de microcirugía que no supere un tercio del diámetro total del vaso. La tracción del vaso impide el sangrado y facilita la manipulación. Se recomienda el uso de la pinza de iris, levanta el borde del ojal realizado en la vena y permite introducir un catéter con un diámetro externo de hasta 1 mm acabado en una punta roma para evitar perforar la vena. Por el contrario, si se emplean catéteres blandos como los de silicona, estos pueden biselarse para facilitar su entrada en el vaso. Finalmente, se avanza el catéter y se aprieta el nudo proximal sobre la vena y en catéter simultáneamente. El catéter que debía estar previamente lleno de una solución salina heparinizada, se lava para comprobar su permeabilidad y para empujar cualquier resto de sangre que pueda haberse alojado. Si la función del catéter es administrar sustancias, este puede avanzarse unos pocos mm, pero si es para la extracción de sangre, este debe avanzarse hasta la vena cava unos 3 cm aproximadamente en una rata de 250 g.

Para la implantación crónica del catéter resulta más adecuado insertar el mismo a través de la piel en un punto diferente al de la herida quirúrgica y de difícil acceso para el animal. El área más empleada es la zona interescapular, es decir, en la parte posterior del cuello en su base. El método más sencillo de tunelización del catéter es insertando una aguja a través de la piel con el diámetro interno lo suficientemente grande como para que pase el catéter. Una vez avanzado el catéter se retira la aguja. Es recomendable fijar el catéter a la piel en su punto de salida con hilo de sutura.



Una de las complicaciones más frecuentes de la implantación crónica de catéteres es la denominada sepsis por catéter.

### 8.3.3. Castración: ovariectomía y orquiectomía:

La ovariectomía consiste en la extirpación de los ovarios y el útero. El abordaje se realiza mediante laparotomía media como se ha indicado previamente. Los cuernos uterinos discurren en forma de 'Y' desde la zona inguinal hasta la zona abdominal media a ambos lados. Normalmente, hay que desplazar el intestino para visualizar los cuernos uterinos. En su punto más craneal (hacia la cabeza) están anclados junto con el ovario a la parte posterior (superior en animales) de la pared abdominal mediante el ligamento ovárico. Una vez localizado el cuerno uterino se realiza una apertura de la membrana que une el mismo al abdomen ligando, si es necesario, los vasos que puedan sangrar. El sangrado se reduce si en vez de cortar con tijeras dicha membrana se realiza un ojal con las tijeras o con unas pinzas y se abre empleando la técnica de disección roma.

Los vasos grandes se ligarán con hilo de sutura. En este punto, el cuerno uterino está fijado al ovario por un extremo y al útero por el otro. Para separar el ovario de la pared abdominal se realizan dos ligaduras a ambos lados del ligamento con una sutura de 3/0 ó 4/0 seccionado en medio.

Una vez separado el cuerno uterino junto con el ovario se realiza la misma operación con el cuerno opuesto. Finalmente, se realizan dos ligaduras en la base del útero dejando un espacio suficiente para cortar el útero con unas tijeras. Las ligaduras nunca deben estar muy cerca del punto de corte, ya que es probable que la ligadura se deslice. En animales de tamaño medio y grande como perros también se ligan individualmente las arterias uterinas que discurren a cada lado del útero. Los principales puntos de sangrado son estas arterias y la arteria ovárica que discurre paralela al ligamento ovárico. Una vez terminado el procedimiento, la cavidad abdominal se cierra por planos.

En el macho la extirpación de los testículos u orquiectomía se lleva a cabo realizando un corte sobre el escroto y posteriormente sobre la cápsula fibrosa que recubre cada testículo. El pedículo que une el testículo contiene el conducto deferente además de los vasos y nervios. En roedores pueden realizarse dos ligaduras haciendo el corte entre ambas mientras que en animales más grandes es recomendable ligar la arteria de forma independiente para minimizar el riesgo de sangrado. Si el corte en el escroto no es muy grande puede dejarse la herida abierta para evitar el acumulo de fluidos o bien realizar uno o dos puntos sueltos de sutura con una distancia suficiente para conseguir este mismo objetivo.

#### 8.3.4. Cesárea:

Permite la extracción de los fetos de los cuernos uterinos. Para la obtención de fetos viables, la intervención debe realizarse a partir del día 20 de gestación.

El abordaje se realiza mediante laparotomía media colocando al animal de forma que la cola está situada hacia el investigador. Los cuernos se visualizan fácilmente extrayendo suavemente uno de ellos con una gasa humedecida. Con la ayuda de unas tijeras, se realiza un corte por el borde exterior del cuerno (opuesto a la unión con la placenta y la irrigación sanguínea) lo suficientemente grande para extraer el feto. A partir de este corte es posible extraer los fetos adyacentes pero es posible que sea necesario ampliar el corte o realizar otro para extraer el resto de fetos de un cuerno uterino. El desarrollo del útero en esta fase avanzada de gestación puede requerir el empleo de hemostasia para controlar el sangrado. Esto no es necesario en estadios menos avanzados.

Para extraer el feto dentro del saco amniótico se colocará una pinza curva entre la placenta que tiene forma de disco y el útero. El sangrado que se produce al retirar el feto se controla aplicando una gasa con una presión suave durante unos segundos. El proceso se repite con el resto de los fetos y, en el caso de que la madre no sea sacrificada, el útero se sutura con sutura reabsorbible de 4/0, se coloca en su posición anatómica normal y se cierra la cavidad abdominal por planos.

#### 8.4. Anestesia y analgesia

Los sedativos, analgésicos y anestésicos generales deben utilizarse para el control del dolor y de la angustia, a menos que los objetivos del estudio no permitan su uso. En este último caso, es indispensable obtener la aprobación del Comité de protección de los animales para llevar a cabo la experiencia.

Los agentes anestésicos afectan frecuentemente los sistemas cardiovascular, respiratorio y termorregulador, además del sistema nervioso central (SNC). Por lo tanto, se procurará mantener dentro de los límites fisiológicos normales la circulación, la función respiratoria y la temperatura de cuerpo del sujeto anestesiado. La intubación endotraqueal asegura que las vías respiratorias queden libres y no obstruidas.

Puede ocurrir hipotermia durante la exposición a gases anestésicos y durante la cirugía intra-abdominal, particularmente en animales pequeños. Esta puede resultar en la muerte o en una recuperación mucho más prolongada de la anestesia. El grado de hipotermia puede ser reducido si se coloca el animal sobre un colchón calentado con agua u otro dispositivo que ayude a mantener el calor del cuerpo como una lámpara con una bombilla de calor.

La función de los agentes analgésicos es la de eliminar la percepción del dolor en los animales. Deben emplearse antes de que el animal perciba el dolor, es la denominada analgesia preventiva. En la práctica, el analgésico debe ser administrado 15-30 minutos antes de que el animal se recupere de la anestesia, durante ésta, o bien antes de ella, como parte de la premedicación anestésica. Los analgésicos también se pueden utilizar durante la operación para reducir la dosis de anestésico empleado y reducir también sus efectos depresores en el sistema cardiovascular.

#### 8.4.1. Manejo del animal:

El animal debe ser manejado siempre delicadamente y con calma, para no excitarlo ni asustarlo. La excitación prolongada perturba los sistemas circulatorio y metabólico del paciente e induce un estado de choque. Además, intentar anestesiarse a un animal en este estado crea ciertos problemas físicos, e incrementa las posibilidades de una respuesta anormal a los anestésicos. Estos puntos son particularmente importantes cuando se trata de inmovilizar y anestesiarse animales muy nerviosos.

#### 8.4.2. El ayuno:

Los perros, los primates no humanos y los cerdos deberían ser mantenidos en ayuno durante las 8-12 horas antes de la anestesia, a fin de minimizar el riesgo del vómito durante la inducción o en el período de recuperación.

Para los mamíferos muy pequeños o inmaduros, por su metabolismo más alto, el período de ayuno debe ser mucho más corto, generalmente entre dos a cuatro horas.

Para rumiantes, un ayuno de 12-24 horas puede ayudar a reducir la incidencia de timpanismo.

El ayuno preanestésico de conejos o de pequeños roedores no es necesario, ya que estos animales no vomitan durante la inducción. Los cobayas deben ayunar 6-12 horas antes de la anestesia.

El ayuno en animales gestantes de todas las especies, particularmente en rumiantes, puede provocar severos trastornos metabólicos. Con excepción de los rumiantes, que se debe retirar 3 horas antes, todos los animales deben tener agua disponible hasta aproximadamente una hora antes de la inducción de la anestesia.

#### 8.4.3. Protocolos anestésicos:

La elección del protocolo, compuesto por el fármaco o fármacos a utilizar, la vía y modo de administración y la dosis de los mismos, dependerá de factores como la especie, el estado del animal y el objetivo del experimento, el tipo de procedimiento y su duración y de la experiencia del investigador y los medios de los que disponga. En este sentido, las recomendaciones del comité ético institucional son el mejor sistema de asesoramiento.

A continuación se exponen unas nociones básicas para diseñar un protocolo para cada una de las especies animales estudiadas. Estos protocolos deberán adaptarse a todos los factores que rodean una investigación y deben ser supervisados y aprobados por el comité ético.

##### a) Pequeños roedores de laboratorio (rata, ratón, cobaya y hámster):

Los agentes anestésicos utilizados incluyen los barbitúricos, la ketamina, y las combinaciones de ketamina y analgésicos neurolepticos.

La ketamina utilizada sola produce una depresión respiratoria importante por lo que no se recomienda utilizarla como único inductor: si se administra en dosis suficientemente altas se alcanza un buen plano anestésico en roedores pequeños, aunque con el riesgo aumentado de depresión respiratoria. La inyección intramuscular de ketamina/xylazina ocasiona necrosis muscular en el hámster Sirio, por lo que está contraindicada en esta especie. El mismo problema se ha notado con la combinación fentanil/droperidol en el cobaya.

Los barbitúricos se usan frecuentemente, pero son analgésicos muy pobres, y causan una mortalidad alta, especialmente cuando están dados por vía intraperitoneal o cuando las soluciones comerciales no diluidas se administran directamente por vía intravenosa. Un buen método anestésico es combinar los barbitúricos con un sedante, un tranquilizante o un opioide. Para emplear la anestesia por inhalación, se debe utilizar una cámara de inducción. La anestesia puede mantenerse con una máscara facial. La intubación endotraqueal es difícil en roedores pequeños y requiere laringoscopios y tubos especialmente diseñados.

La administración segura de la anestesia general en el cobayo es notoriamente difícil, ya que este animal frecuentemente mantiene su reflejo pedal y hace movimientos de contorsión, aunque esté profundamente anestesiado. Su respuesta a muchos anestésicos inyectables es muy variable. Se pueden observar algunas complicaciones post-anestésicas tales como infecciones respiratorias, perturbaciones digestivas o depresión generalizada. La anestesia medular ofrece una alternativa adecuada en estos animales, aunque es una técnica compleja.

Utilizando una mezcla igual de oxígeno y de dióxido de carbono se pueden llevar a cabo en roedores procedimientos muy breves (p. ej., la extracción de sangre del plexo orbital), siempre y cuando se saque al animal de la cámara de inducción tan pronto como el reflejo pedal haya desaparecido.

b) Conejo:

Se han empleado de forma habitual combinaciones de analgésicos neurolépticos y de ketamina con la xylazina, con la acepromazina o la azaperona. La ketamina sola no produce una analgesia o una anestesia adecuadas. Una técnica de perfusión intravenosa continua de ketamina y de xylazina puede mantener al conejo en estado de anestesia leve durante períodos de hasta 4 horas, pero con una hipoxia e hipotensión importantes.

Los conejos no toleran bien del todo los anestésicos por inhalación como halotano e isoflurano, por contra sí toleran la inducción con máscara. La intubación endotraqueal en el conejo es relativamente difícil por razones anatómicas, por eso es preferible la utilización de mascarillas.

Los barbitúricos, por sí solos, no son recomendados en conejos, porque la dosis requerida para que se produzca una anestesia quirúrgica está muy próxima a la dosis mortal. Los barbitúricos pueden emplearse si están combinados con un sedante o un tranquilizante. Cuando se usa atropina, deben ser dosis altas para neutralizar la acción de la atropinasa sérica.

c) Perro:

Para la anestesia general se puede administrar un sedante como la xylazina, seguido por la inducción intravenosa con un barbitúrico de duración ultra-corta como el tiopental, se intubará al animal y el mantenimiento se llevará a cabo con un anestésico por inhalación como el isoflurano. Como alternativa, se pueden usar barbitúricos de mediana o de larga duración, pero son analgésicos poco eficientes y pueden resultar en una depresión respiratoria y cardiovascular profundas. Se pueden ejecutar cirugías menores con analgésicos neurolépticos, combinados con xylazina o con diazepam.

d) Primates no humanos:

La ketamina y sus combinaciones son las más frecuentemente utilizadas para la inmovilización y sedación, especialmente cuando se desea una recuperación rápida. Los analgésicos neurolépticos también se emplean con frecuencia. Para anestesias quirúrgicas lo más común es sedar al animal para posteriormente intubarlo y proceder a la inducción con un anestésico inhalatorio, las técnicas pueden ser muy parecidas a las utilizadas en el ser humano.

e) Oveja y cabra:

En estos animales muchos procedimientos quirúrgicos pueden llevarse a cabo bajo anestesia local o regional. Los problemas principales causados por la sedación y la anestesia general son la regurgitación, la hipoventilación y el timpanismo. El uso de la atropina en rumiantes está muy discutido, ya que induce el timpanismo y aumenta la viscosidad de la saliva, mientras que no disminuye la cantidad de la misma.

A la hora de administrar xylazina en ovejas y cabras es mejor utilizar la vía intravenosa, ya que la administración intramuscular produce resultados imprevisibles. Se han registrado casos de cabras que son particularmente sensibles a la xylazina. El timpanismo es un problema frecuente que aparece tras la administración de xylazina, y también puede inducirse el aborto en el último trimestre con este fármaco. La combinación xylazina/ketamina con o sin guaifenesina puede utilizarse para cirugías más cortas. Para ovejas, se recomienda inyectar el Saffan<sup>md</sup> (combinación de dos esteroides, alfaxalone y alfadolone) y la combinación ketamina/diazepam.

El tiopental es útil para la inducción de la anestesia. El pentobarbital no se recomienda, especialmente en cabras, debido a la depresión respiratoria que produce. Debemos tener presente que los animales de menos de tres meses de edad metabolizan muy mal los barbitúricos.

La inducción anestésica con halotano o isoflurano con una máscara inhalatoria es muy útil en estas especies. Siempre que se emplee esta técnica es necesario intubar a las ovejas para prevenir la aspiración de alimentos en el caso de que se produjera una regurgitación. Para proceder a la intubación se necesitará un laringoscopio. La vaporización de lidocaína sobre las cuerdas vocales de las ovejas antes de la intubación previene los espasmos de la laringe y nos facilitará la labor de intubación.

f) Cerdo:

En este animal se recomienda el uso de drogas neutralizantes como la xylazina o los opioides para evitar la depresión respiratoria que se suele producir en el cerdo a altas dosis de fármacos anestésicos. La anestesia epidural también se usa comúnmente en el cerdo. La ketamina combinada con la xylazina, el diazepam, la acepromazina o el fentanil/droperidol, produce buenos resultados como anestésico general, así como otros anestésicos inyectables como el Saffan<sup>md</sup> y la combinación tiletamina/zolazepam. Los barbitúricos se usan generalmente combinados con un sedante. La azaperona provoca sedación en el cerdo, pero ninguna analgesia.

Los cerdos toleran muy bien los anestésicos por inhalación y la inducción se realiza de manera sencilla en cerdos pequeños con una máscara inhalatoria. La intubación de la tráquea es difícil por razones anatómicas, y se debe vaporizar lidocaína sobre las cuerdas vocales para prevenir

espasmos de la laringe.

En los cerdos, como consecuencia a la anestesia por inhalación (especialmente si se emplea el halotano), se han observado casos de hipertermia maligna. La predisposición a la hipertermia es hereditaria, y es más común en el Landrace y Poland chino. Por eso se debe evitar el uso de este anestésico en el cerdo.

## 8.5. Eutanasia

El término "eutanasia" proviene de los vocablos griegos "eu" (bueno) y "thanatos" (muerte) o una muerte sin dolor. El método usado para realizar la eutanasia debe ser humanitario, es decir, que debe realizarse sin dolor, minimizar el miedo y la ansiedad, además de ser confiable, reproducible, irreversible, sencillo, seguro y rápido. Cuando sea posible, deberá ser también estéticamente aceptable para la persona que ejecuta el procedimiento, así como también para cualquier observador. Con el uso de animales en la investigación, enseñanza y la experimentación, la comunidad científica se tiene que responsabilizar de la aplicación de un criterio científico y actualizado para asegurar que, cuando hay que realizar la eutanasia a un animal, este se beneficie de una "muerte humanitaria". Aun en estudios que no son peligrosos o invasivos para los animales, en algunas circunstancias es necesario someterlos a la eutanasia por lo tanto debe estar regulada la manera de llevarla a cabo.

La elección del método de eutanasia se basa en el cumplimiento del siguiente criterio: "El criterio más importante para aceptar un método de eutanasia como humanitario es que tenga una acción inicial de depresión sobre el sistema nervioso central (SNC), para asegurar la insensibilidad inmediata al dolor".

Aunque el principio de este criterio sea siempre cierto, debería añadirse "para producir la inconsciencia rápida y así asegurar la insensibilidad al dolor; este estado debe acompañarse del cese de la actividad cardíaca y respiratoria."

Es importante que el principio de las "Tres R" de **Russell y Burch** (1992), se aplique también para los métodos de eutanasia. El refinamiento de los procedimientos es un tema que se debería considerar a fin de asegurar que se apliquen los criterios para una muerte humanitaria.

La aplicación de estas directrices para la eutanasia requiere un juicio profesional con competencia técnica, comprensión del animal, de su comportamiento y de su fisiología, así como también una comprensión del impacto ambiental y ecológico, de la sensibilidad de otros miembros del personal y de los intereses de la sociedad en general.

#### 8.5.1. Criterios para una muerte humanitaria:

La persona que aplica el método de eutanasia es el factor más importante para asegurar que la muerte de un animal sea humanitaria. Sin considerar si el procedimiento se aplica a un animal individual o a un grupo, siempre se deben cumplir los siguientes criterios:

- Una muerte sin señales de pánico, dolor o desamparo.
- Un tiempo mínimo para llegar a la inconsciencia, es decir, casi inmediato.
- Confiable y reproducible.
- Seguridad para el personal involucrado.
- Mínimos efectos fisiológicos y psicológicos indeseables sobre el animal.
- Compatibilidad con los requerimientos y propósitos del estudio científico.
- Efectos emocionales mínimos o nulos sobre el observador y el operador.
- Impacto mínimo sobre el medio ambiente o la ecología.
- Equipo mecánico sencillo, barato y de mantenimiento fácil.
- El local estará lejos y separado de las salas donde se alojan a los animales.

A menudo es difícil reconocer la evidencia de estrés cuando los animales son sometidos a la eutanasia en presencia de otros animales. Informes recientes sobre feromonas exponen la evidencia de que los animales pueden comunicarse entre ellos mediante varios tipos de señales. En ciertas experimentaciones con ratas, la tensión inducida por el tratamiento experimental puede dar origen a la producción de señales que afectan a los animales que no están tratados y que están alojados en proximidades. Por tanto es imprescindible tener en cuenta todos los criterios anteriores para garantizar que la eutanasia se realiza en las mejores condiciones. A este respecto, los investigadores deben doblar esfuerzos puesto que una adecuada planificación de la investigación y sus necesidades reduce de forma sustancial el sacrificio inútil de animales excedentes.

#### 8.5.2. Métodos de eutanasia:

##### a) Físicos:

Persiguen la pérdida inmediata de la consciencia por un trauma cerebral. Son desagradables para el operador y observadores, pero realizados por personal entrenado son rápidos, seguros y probablemente inducen un dolor y angustia mínimos en los animales. Por el contrario, en manos inexpertas se puede producir una angustia y dolor elevados. Presentan la ventaja de no requerir de sustancias que pudieran interferir con los objetos del experimento.

- Disparo: se realiza en la cabeza destruyendo el cerebro y es el método más empleado en mamíferos de gran tamaño. Una alternativa al disparo convencional es el disparo con bala



cautiva, donde un émbolo sale del arma a gran velocidad. Posteriormente el animal debe ser exanguinado.

- **Conmoción:** este método produce aturdimiento mediante un golpe en la cabeza. Puede emplearse en conejos o roedores. Es un método desaconsejado a no ser que se realice por un experto. Tras el golpe en la zona frontal del cráneo con un martillo o un hacha, el animal debe ser exanguinado inmediatamente.
- **Aturdimiento eléctrico:** se emplea en especies de tamaño medio, se realiza utilizando un equipo especial que dispone de unas tenazas por las cuales circula una corriente eléctrica. Se deben colocar las tenazas a ambos lados de la cabeza. El paso de la corriente por el cerebro produce inconsciencia, pero esta es temporal, por lo que habrá que exanguinar al animal rápidamente.
- **Dislocación cervical:** se usa en el ratón, roedores jóvenes y conejos. Consiste en provocar la ruptura de las vértebras cervicales, se debe sujetar la cabeza del animal y estirar de forma firme y rápida de la base de la cola. La aplicación correcta del método debe producir una lesión irreversible del tallo cerebral e inconsciencia inmediata. La muerte se confirma después por exanguinación o lesión irreversible en cerebro o corazón. Se recomienda usar sedación. Es un método desagradable para el operador.
- **Decapitación:** empleado en roedores y conejos de pequeño tamaño. Implica la separación total de la cabeza del tronco. Este método requiere de una guillotina o un instrumento cortante que realice la operación de manera rápida y en un solo intento. Se recomienda que el animal esté previamente sedado.
- **Irradiación con microondas:** empleada en animales de peso inferior a 300 g, se aplica una radiación de microondas sobre el cerebro. Se emplea para fijar los metabolitos del cerebro en el momento de la muerte. Es una técnica poco utilizada ya que requiere de un equipamiento específico.

b) **Farmacológicos:**

Generalmente consisten en la administración de fármacos anestésicos que producen inconsciencia, y a dosis elevadas fallo cardiovascular, respiratorio y muerte. No son aceptables agentes químicos que produzcan la muerte sin una inconsciencia previa como el cloruro potásico o los bloqueantes neuromusculares.

- **Dióxido de carbono:** para la utilización de este gas encontramos métodos contradictorios (CONLEE, 2005). Algunos autores recomiendan suministrar concentraciones superiores al

60%, donde se produce inconsciencia a causa del efecto anestésico en el cerebro. Por contra, otros autores afirman que concentraciones por encima del 70% producen la muerte pero antes provocan una aparente sensación de falta de aire en el animal. La aplicación ideal se da cuando administramos oxígeno simultáneamente.

- Monóxido de carbono: es un gas inodoro e incoloro, su uso es adecuado en animales pequeños, ya que los animales de mayor tamaño pueden presentar vocalizaciones. Los animales deben introducirse en cámaras selladas con una concentración de monóxido de al menos un 6%. Este método resulta muy peligroso para el manipulador debido al riesgo de inhalación accidental.
- Anestésicos inhalatorios: estos agentes producen inicialmente anestesia y, posteriormente, muerte por sobredosis. El halotano y el isoflurano son lo más utilizados. Debemos tener presente que en el conejo no se emplean debido a que la inhalación de estos agentes les resulta desagradable y pueden sufrir angustia e hipoxia.
- Agentes inyectables: la administración de estos agentes por vía intravenosa proporciona el método más rápido de eutanasia y es el más adecuado si no se produce estrés o angustia al animal durante el procedimiento. Como norma general, una dosis de dos a cuatro veces superior a la empleada para producir anestesia producirá una parada cardiorrespiratoria. Para que sea más rápido y potente suele escogerse como vía la intravenosa, pero en algunas especies es muy difícil como en el caso de los roedores donde la vía intraperitoneal es la más empleada. Por contra, las vías subcutánea e intramuscular no son adecuadas porque inducen el efecto muy lentamente y requieren dosis superiores. Los fármacos del grupo de los barbitúricos son los más empleados y entre ellos, el pentobarbital.

## **9. BIBLIOGRAFÍA:**

### **9.1. Legislación**

-Unión Europea. Directiva del Consejo de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos (2010/63/UE).

-Ministerio de la Presidencia (2005) Boletín Oficial del Estado. R.D. 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. (BOE 21-10-2005).

-Diari Oficial de la Comunitat Valenciana, Conselleria de Agricultura, Pesca y Alimentación. DECRETO 13/2007, de 26 de enero, del Consell, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos en la Comunitat Valenciana.

### **9.2. Publicaciones**

-Anon. Communal housing makes for happy rabbits. CCAC (Canadian Council on Animal Care) Resource. 1989; 13(2): 4.

-Baroja JL. La Fisiología. Origen histórico de una ciencia experimental. Ed. Akal. Madrid: 1991.

-Beaver BV. Environmental enrichment for laboratory animals. ILAR. 1989; 31(2):5-11.

-Beynen AC. Laboratory animal nutrition and experimental results. Scand J Lab Anim Sci. 1987; 14: 89-97.

-Boyd J, Love JA (1995). The effects of dividers on the nesting sites of mice. Frontiers in Laboratory Science, oral presentation. 1995; Helsinki, Finland.

-Bryant CE, Rupniak NMJ, Iversen SD. Effects of different environment enrichment devices on cage stereotypes and auto aggression in captive Cynomolgus monkeys. J Med Primatol. 1988; 17:257-269.

-Canadian Council on Animal Care. Guidelines on: laboratory animal facilities, characteristics, design and development. 2003.

-Close B, et al. Recommendations for euthanasia of experimental animals. Lab Anim. 1996. 30; 293-316.

-Federation of Animal Science Societies. Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching. 1999.

-Festing, MF. International Index of laboratory animals. Laboratory Animal Ltd. London; 1987.

-Fossum TW. Small Animal Surgery Textbook. Mosby-Year Book. 2007.

- Fox JG, Anderson LC, Cohen BJ, Loew FM, Quimby FW. Laboratory animal medicine. Academic Press. 2002.
- Frasier D, Talka J. Review: Facility design considerations for select agent animal research. ILAR J. 2005;46(1):23-33.
- Gauthier C, Griffin G. Using animals in research, testing and teaching. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 2005; 24:735-745
- Guerrero J. Aspectos éticos de la experimentación con animales. Lecturas Curso Capacitación Uso Animal de Experimentación. Universidad Autónoma de Barcelona;1999.
- Grandin T. Livestock Handling and Transport. Colorado: Ed. CABI. 2007.
- Haemisch A, Voss T, Gärtner K. Effects of environmental enrichment on aggressive behaviour, dominance hierarchies, and endocrine states. Refining rodent husbandry: the mouse 257 in male DBA/2J mice. Physiol Behav. 1994; 56(5): 1041-8.
- Harkness JE. The biology and medicine of rabbits and rodents. Philadelphia: Ed. Lea & Febiger. 1983.
- Hobbs KR. Hamsters. Handbook on the care and management of laboratory animals. Oxford: Ed. UFAW Longman Scientific and Technical. 1987; 377-392.
- Jerome CP, Szostak L. Environmental enrichment for adult, female baboons (*Papio anubis*). Laboratory Animal Science. 1987; 37, 508-9.
- Lestam M, Gunnarson A. The ethics of animal experimentation. Ac. Physiologica Scad. 1986; 1-243.
- MAPA (Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación). Orden por la que se establecen especificaciones bacteriológicas para los productos destinados a la alimentación de animales. BOE 17 de Febrero, 1997.
- Morton DB, Griffiths PH. Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animal and a hypothesis for assessment. Veterinary Record. 1985; 116: 431-436.
- National Research Council. Psychological well-being of nonhuman primates. The National Academic Press. 1998.
- National Research Council. Guide for the care and use of laboratory animals. The National Academic Press. 1996.
- Olsson IA. Improving housing conditions for laboratory mice: a review of environmental enrichment. Laboratory Animals. 2002; 36: 243-270.
- Percy DH, Barthold SW. Pathology of laboratory rodents and rabbits. Blackwell Publishing Professional. 2007.
- Poole T. Handbook on the care and management of laboratory animals. Longman Scientific & Technical. 1987.

- Poole, T. Happy animals make good science. Lab Anim. 1997; 31(2): 116-24.
- Reece WO. Duke's physiology of domestic animals. Cornell Univ. Press. 2004.
- Russell, W.M.S. and Burch, RL. The Principles of Humane Experimental Technique. Methuen. 1959.
- Sandoe P. Animal Research and Ethics. Svendsen P, Hau J eds. Handbook of Laboratory Animal Science.1994.
- Solas GV. Guidelines for the Nutrition of Laboratory Animals. Society for Laboratory Animal Science. 2002; 17.
- Van de Weerd Ha, Van Loo PL, Zutphen LF, Koolhaas JM, Baumans V. Strength of preference for nesting material as environmental enrichment for laboratory mice. Appl Anim Behav Sci. 1998; 55:169-382.
- Weihe WH. The laboratory rat. Handbook on the care and management of laboratory animals. Ed. UFAW Longman Scientific and Technical. 1987; 309-330.
- Wolff A, Rupert C. A practical assessment of a nonhuman primate exercise program. Lab. Anim. 1991; 20(2):36-39.
- Wright, KC. Working with laboratory animals: general principles and practical considerations. Journal of Vascular. 1997; 363-373.
- Zúñiga JM, et al. Ciencia y Tecnología en protección y experimentación animal. Macgraw Hill. 2001.
- Zúñiga JM, et al. Estandarización de los métodos y protocolos de esterilización de dietas para reactivos biológicos convencionales de alta calidad y SPF. Ed. B&K. 1999.

### **9.3. Páginas web (fecha de consulta)**

- Acta del bienestar de los animales (24/05/12): <http://www.aphis.usda.gov/ac7publications.html>
- American College of Laboratory Animal Medicine. Rodent Surgery.ACLAM (02/04/12): [http://www.aclam.org/education/guidelines/position\\_rodentsurgery.html](http://www.aclam.org/education/guidelines/position_rodentsurgery.html)
- Animal Welfare Information Center (02/04/12): <http://www.nalusda.gov/awic/awic.htm>
- Animals Rights Law Center (06/07/12): <http://www.animallaw.com>
- Enriquecimiento ambiental (15/05/12): <http://www.animalwelfare.com/labanimals/biblio/enrich.htm>
- Federación de las Universidades para el bienestar animal (24/06/12): [www.ufaw.org.uk](http://www.ufaw.org.uk)
- Federation of Laboratory Animal Science Associations (FELASA) (02/04/12): <http://www.felasa.org>

- Guidelines for the veterinary care of laboratory animals (19/05/12): <http://www.felasa.eu/recomendations.htm>
- Información sobre animales de granja y de laboratorio (02/09/12): <http://www.biome.ac.uk>
- Journal of Experimental Animal Science (09/05/12): <http://www.elsevier.com>
- Laboratory Animal (19/05/12): <http://www.lal.org.uk>
- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (06/07/12): <http://www.magrama.gob.es/es/>
- Monografía de los tipos de eutanasias. Report of the AVMA Panel on euthanasia (04/07/12): <http://www.secal.es>
- The Norwegian Reference Centre for Laboratory Animal Science & Alternatives (05/09/12): <http://film.oslovet.norecopa.no/Tappingkanin/index.html>